



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107829123 A

(43)申请公布日 2018.03.23

(21)申请号 201710929610.3

(22)申请日 2017.10.09

(71)申请人 深圳市中科摩方科技有限公司

地址 518114 广东省深圳市龙岗区布吉街道甘李二路11号中海信创新产业城19栋2层

(72)发明人 王怀雨 刘涵霞 朱剑豪

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205

代理人 薛建强

(51)Int.Cl.

C25D 11/06(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

A61L 27/30(2006.01)

A61L 27/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图13页

(54)发明名称

一种表面双层涂层的铝合金及其制备方法
和应用

(57)摘要

本发明公开了一种表面双层涂层的铝合金及其制备方法和应用。具体而言，本发明通过微弧氧化法在铝合金表面生成双层涂层，同时赋予涂层不同的金属元素，改变铝合金表面结构和物理化学性能，同时抑制率离子的释放；并且这种涂层还能改善铝合金表面的生物活性，使其在修复骨缺损的同时也促进新骨再生的功能，同时能抵抗植入物细菌感染，减缓炎症反应；获得理想的医用功效。并且铝合金质量轻，强度高，接近或超过优质钢，塑性好，可加工成各种型材，具有优良的导电性、导热性和抗蚀性。并且基于微弧氧化的元素掺杂涂层制备方法简单，成本低，加上铝合金材料成本低廉，可批量生产，利于工业生产。因此，这种改性后的植入材料在生物医用领域具有广阔的应用前景。

A

CN 107829123 A

CN

1. 一种表面双层涂层的铝合金,其特征在于:所述涂层的内层为氧化物涂层;外层为掺杂微量元素的氧化物涂层;所述微量元素选自钙、铁、锌、镁、钽中的一种或几种。
2. 根据权利要求1所述的表面双层涂层的铝合金,其特征在于,所述氧化物选自氧化铝。
3. 根据权利要求1或2所述的表面双层涂层的铝合金,其特征在于,所述外层涂层微量元素的含量在0.2%~15%之间。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的表面双层涂层的铝合金的制备方法,其特征在于,所述双层涂层通过微弧氧化技术制备;所使用的电解液主盐是磷酸盐。
5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述微弧氧化的电参数包括:反应体系的脉冲电压为10~60kW,电流密度为1~10A·dm⁻²,频率为200~800Hz,脉冲占空比为1%~30%,反应时间5~120分钟。
6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:在微弧氧化之前,首先对铝合金表面进行打磨、抛光、清洗处理。
7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述双层涂层的总厚度为5~100微米,外层为致密性多孔结构,内层为实心结构涂层。
8. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述电解液主盐是六偏磷酸钠;以及,使用相应的醋酸盐或草酸盐掺杂微量元素。
9. 根据权利要求1-3任一项所述的表面双层涂层的铝合金在生物医用领域的应用。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述铝合金作为植入材料应用于医用再生材料、功能性材料、生物活性材料领域。

一种表面双层涂层的铝合金及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种表面改性的铝合金,尤其涉及一种表面双层涂层的铝合金及其制备方法和其在生物医用领域的应用。

背景技术

[0002] 随着临床医学和材料科学的不断发展,新的医用金属植入材料不断应用于临床,特别在骨科领域中,作为骨内金属植入体和硬组织修复材料的接骨板、髓内针、钉-棒系统以及人工关节假体等等医用金属植入材料得到了广泛的临床应用。但是对于生物有机体而言,医用金属植入材料毕竟还是异物,在物理和化学性能方面与体内环境还存在着巨大的区别。因此,提高医用金属植入材料的生物相容性依旧是研究的主题,让植入体能够与周围的骨组织形成稳定的生物结合。

[0003] 临幊上目前用于外科植幊假体和医用矫形器械材料的产品主要是不锈钢产品、钴合金材料产品、钛合金材料产品等三大系列产品[1]。虽然医用不锈钢(Stainless Steel as Biomedical Material)拥有良好的机械特性,很适合作为内植材料,但目前还并未完全解决其在体内容易腐蚀的问题,只适合于作为暂时性的内植物材料,而不宜长期植幊[2]。与不锈钢材料相比,钴合金具有更稳定的纯化膜和更好的耐腐蚀性,并具有较强的耐磨损性,更适于长期应用于体内的高应力部位[3]。骨科临幊上所使用的人工关节假体上,耐磨损部件多采用此材料制造。但是由于钴合金价格较贵,并且钴合金制作的人工髋关节由于金属磨损腐蚀造成Co、Ni等离子溶出,在体内的松动率较高,析出的Co、Ni元素又存在着严重致敏性等生物学问题[2],在体内容易引起细胞和组织坏死,从而导致患者疼痛以及关节的松动、下沉,应用受到一定的限制。具有相对较低的材料密度、兼具有比强度高、弹性模量低、耐腐蚀、卓越的生物相容性等优点的钛合金材料[4-5]在临幊应用研究远远超过前两者。然而医用钛合金的弹性模量(55-120GPa)比人体皮质骨(17GPa)高出了2-6倍,这也导致了它在植幊骨缺损部位后会由于对毗邻骨组织的应力屏蔽效应(stress shielding effect)而不利于植幊物与骨组织界面附近的新骨生长,并且钛合金的成本也不低廉。越来越多的新型合金植幊材料正在被开发研究,如形状记忆合金植幊材料[6]和纯金属钽、铌、锆[7]。

[0004] 同时,近年来这些医用合金植幊材料的表面改性工艺是不断发展的,微弧氧化(Microarc oxidation,MAO)[8]就是其中一种不断完善的表面处理技术,这种技术又称微等离子体氧化(Microplasma oxidation,MPO),是通过电解液与相应电参数的组合,在铝、镁、钛及其合金表面依靠弧光放电产生的瞬时高温高压作用,生长出以基体金属氧化物为主的陶瓷膜层。具有材料表面硬度高、耐磨性能好、工艺可靠、设备简单、操作方便等特点。这种工艺过程中加入的钙、铁和锌等均是人体重要的微量元素,其有助于细胞增殖分化及有关酶系统发挥其功能活性,加速骨的形成和钙化,从而促进骨折愈合[9];同时,锌还具有抑菌性能[10]。

[0005] 医用合金植幊材料在使用过程中特别容易出现以下三个问题:①合金材料中的微

量元素的析出导致的潜在细胞生物毒性及组织器官的损伤;②随着使用年限的增加,潜在的关节假体材料的表面金属磨削导致的局部炎症反应;③植入材料的相关感染的风险,细菌生物膜的形成等等导致假体的松动等等。而植入物相关感染对外科医生来说,尤为棘手,一旦出现,便会导致灾难性后果。

[0006] 参考文献

- [0007] [1] Ibrahim MZ,Sarhan AD,Yusuf F,Hamdi M.Biomedical materials and techniques to improve the tribological,mechanical and biomedical properties of orthopedic implants.Journal of Alloys and Compounds,2017;714:636-667.
- [0008] [2] 张永涛,刘汉源,王昌,程军,石瑾,王嵒,于振涛.生物医用金属材料的研究应用现状及发展趋势.[J].热加工工艺.2017,46(4):21-26.
- [0009] [3] Chenakin S P,Filatova V S,Makeeva IN,Vasylyev MA.Ultrasonic impact treatment of CoCrMo alloy:Surface composition and properties,Applied Surface Science,2017,408:11-20.
- [0010] [4] Muhaffel,F.;Cempura,G.;Menekse,M.;Czyrska-Filemonowicz,A.;Karaguler,N.;Cimenoglu,H.,Characteristics of multi-layer coatings synthesized on Ti6Al4V alloy by micro-arc oxidation in silver nitrate added electrolytes.Surface and Coatings Technology 2016,307,308-315.
- [0011] [5] Niinomi M.Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications.Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials,2008;1:30-42
- [0012] [6] Pun DK,Berzins DW.Corrosion behavior of shapememory,superelastic, and nonsuperelastic nickel-titanium-based orthodontic wires at various temperatures.Dent Mater,2008Feb;24(2):221-227.
- [0013] [8] He XJ,Zhang XY,Wang X,Qin L.Review of Antibacterial Activity of Titanium-Based Implants' Surfaces Fabricated by Micro-Arc Oxidation.Coatings,2017,7(3):45-66
- [0014] [9] Hadley KB,Newman SM,Hunt JR.Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation, and mineralization in the long bones of growing rats.J Nutr Biochem,2010,21(4):297-303
- [0015] [10] Qiao Y,Zhang W,Tian P,Meng F,Zhu H,Jiang X,et al.Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials.Biomaterials,2014;35:6882-97.

发明内容

[0016] 本发明的目的在于给现有医用合金植入材料提供一种更佳的选择,解决了铝合金生物相容差的问题,从而提供一种新型的表面处理铝合金材料的方法及其在医用领域的应用。具体而言,本发明采用微弧氧化的方法来处理铝合金表面,形成一种掺杂元素的氧化铝双层涂层,并且在涂层中掺杂不同的金属元素,所述涂层在改变铝合金表面结构的同时产

生离子长效释放的效果,解决了铝合金在医用领域应用的难题。另一方面,铝合金质量轻,但强度比较高,接近或超过优质钢,塑性好,可加工成各种型材,具有优良的导电性、导热性和抗蚀性。

[0017] 本发明另一目的是在不改变铝合金优异的性能同时改善其表面的生物活性,具体而言,根据本发明的方法得到的表面改性的铝合金在修复骨缺损的同时也促进新骨再生的功能,达到更佳的治疗效果。其还具有良好的抗菌效果,避免植入物细菌感染,减缓炎症反应。同时避免植入物细菌感染,使材料与生物有机体和平共处。使其同时能抵抗植入物

[0018] 这种基于微弧氧化的元素掺杂涂层制备方法简单,成本低,加上铝合金材料成本低廉,可批量生产,利于工业生产。

[0019] 综上所述,这种改性方法及改性后的植入材料具有广阔的应用前景。

[0020] 本发明所采取的技术方案是:

[0021] 本发明首先提供一种表面双层涂层的铝合金,所述涂层的内层为氧化物涂层;外层为掺杂微量元素的氧化物涂层;所述微量元素选自钙(Ca)、铁(Fe)、锌(Zn)、镁、钽中的一种或几种。

[0022] 所述氧化物优选为氧化铝。

[0023] 所述外层涂层微量元素的含量在0.2%~15%之间;优选0.5%~10%。

[0024] 所述铝合金优选LY12铝合金;得到的材料表面的氧化铝涂层均匀又平整,与基底材料表面紧密结合。

[0025] 所述微量元素优选钙、铁、锌、镁中的一种。

[0026] 本发明的另一方面提供上述表面双层涂层的铝合金的制备方法,所述双层涂层通过微弧氧化技术制备;所使用的电解液主盐是磷酸盐。

[0027] 优选地,在涂层外层引入的不同元素掺杂,进行化学成分优化,引入不同的元素离子,优选地,可以掺杂人体重要微量元素,赋予材料一定的生物活性。

[0028] 所述掺杂的微量元素更优选钙、铁、锌、镁、钽中的一种或几种,其赋予材料更多更佳的治疗效果。

[0029] 优选地,在微弧氧化之前,首先对铝合金表面进行打磨、抛光、清洗处理。

[0030] 所述清洗包括依次用丙酮、酒精、去离子水超声清洗。

[0031] 上述微弧氧化的电参数包括:反应体系的脉冲电压为10~60kW,电流密度为1~ $10\text{A}\cdot\text{dm}^{-2}$,频率为200~800Hz,脉冲占空比为1%~30%,反应时间5~120分钟。

[0032] 所述电参数优选为:反应体系的脉冲电压为10~30kW,频率为300~600Hz,脉冲占空比为8%~30%,反应时间5~40分钟。

[0033] 优选地,采用10~30kW的交流脉冲电压,恒流模式。

[0034] 在一个优选实例中,实验电参数包括:电流密度为 $5\text{A}\cdot\text{dm}^{-2}$,频率为500Hz,脉冲占空比为12%,反应时间为8分钟。

[0035] 根据本发明的方法得到的双层涂层的总厚度为5~100微米,外层为致密性多孔结构,内层为实心结构涂层。

[0036] 根据本发明的方法,所述电解液主盐是六偏磷酸钠;掺杂微量元素使用的盐是其醋酸盐或草酸盐。

[0037] 在一个实施方式中,所述元素掺杂使用的化合物包括:水合乙酸钙($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Ca}\cdot$

H_2O) ,水合乙酸锌 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 和水合草酸高铁铵 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{Fe N}_3\text{O}_{12} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 。

[0038] 根据本发明的不同物质掺杂形成了不同的离子释放。

[0039] 本发明的另一方面涉及上述的表面双层涂层的铝合金在生物医用领域的应用。

[0040] 上述应用中,所述铝合金作为医用再生材料、功能性材料、生物活性材料。

[0041] 本发明的有益效果是:

[0042] 本发明通过微弧氧化法在铝合金表面原位生成双层氧化铝涂层,同时涂层里掺杂不同的化学元素,获得具有生物相容性优异医用合金植入材料。

[0043] 本来铝合金虽然具备质轻价廉优势,但由于表面性能不佳,而且容易释放对人体不利的铝离子,在植入材料领域很少被研究。

[0044] 根据本发明的方法得到的铝合金材料,表面生物相容良好,成骨性能优异,且抑菌效果明显。体外细胞实验结果证实,经过本发明改性方法处理得到的铝合金材料具有较好的生物活性和促进干细胞成骨分化的能力,经过本发明得到的铝合金材料表面人骨髓基质干细胞 (hBMSCs) 增殖、成骨基因表达量、矿化钙盐沉积量明显高于没有元素掺杂的试样和未处理试样,甚至优于钛合金,可满足医用植入材料所需的性能要求。同时细菌实验也证实了其具有良好的抑菌效果。细菌实验结果证实,体外细胞和细菌实验证实,经过本发明处理得到的铝合金表面明显好于未处理的铝合金表面,元素掺杂的氧化铝涂层明显优于没有元素掺杂的氧化铝涂层,同时优于钛合金表面。具体而言,经过本发明得到的铝合金材料表面对大肠杆菌 (E.coli.) 和金黄色葡萄球菌 (S.aureus) 抑制明显高于没有元素掺杂的试样和未处理试样,极大扩展了医用材料的生物性能。

[0045] 可见,这种元素掺杂的涂层既能满足医用所需的促进成骨分化要求,又能达到抑制细菌的效果。这种元素掺杂的涂层制备工艺简单,成本低,并且铝合金材料成本低廉质量轻,可批量生产,利于工业生产。

[0046] 综上,根据上述本发明方法微弧氧化制备的元素掺杂涂层及其材料具备以下优点:

[0047] ①这种涂层是均匀致密的,不易脱落,不易变形,机械性能优异。

[0048] ②氧化铝涂层比氧化钛涂层制备成本更低,多孔结构更亲水,更加有利于细胞附着,增加耐腐蚀性同时抑制了基体材料铝的释放。

[0049] ③掺杂的元素都是常规的人体重要的微量元素,其有助于细胞增殖分化及有关酶系统发挥其功能活性,达到既能促进成骨功能,又具有抑菌效果,使生物体的组织和植入生物体的人工材料和平相处。

[0050] ④主体材料铝合金比钛合金质量更轻,价格都低廉,更加容易实现产业化。

[0051] ⑤本发明技术操作简便,后续清洗程序简单,更利于其在生物医用领域的应用

[0052] 产业应用性:经过本发明得到的铝合金材料表面物理化学性能得到显著改善,双层涂层结构清晰,效果明显,既保护了铝合金的主体材料,保留铝合金质轻价廉的优势,又具备更优异的的生物活性和促进干细胞成骨分化的能力,同时还发现了高效抑菌涂层。 hBMSCs 细胞在铁元素掺杂涂层表面增殖明显高于没有元素掺杂的表面和未处理的铝合金表面,锌元素掺杂的涂层的促进成骨分化效果十分突出,并且能高效抑菌,能满足医用合金植入材料所需的生物活性和成骨性能要求。

[0053] 作为一种优选方案,本发明元素掺杂涂层方法不仅限于铝合金,可根据不同的植

入材料进行表面微弧氧化法处理，其他同类型材料也可以。同时元素掺杂也可以是多种元素混合掺杂，不同浓度掺杂等。涂层不局限于双层，甚至可以是三层或以上的多层结构。

附图说明

- [0054] 图1是实施例1中铝合金样品的XRD晶相结构图谱。
- [0055] 图2是实施例1中有涂层的铝合金材料的XPS元素掺杂图谱。
- [0056] 图3 (a) 是实施例1中#blank扫描电镜分析图：(A) 剥离涂层横截面SEM图 (A₁) 内层 (A₂) 外层, (B) Al,O,P对应的元素分布EDS图 (C) 铝合金样品涂层横截面SEM图及其Al,O,P对应的元素分布EDS图。
- [0057] (b) 是实施例1中#Ca扫描电镜图：(A) 剥离涂层横截面SEM图 (A₁) 内层 (A₂) 外层, (B) Al,O,P,Ca对应的元素分布EDS图 (C) 铝合金样品涂层横截面SEM图及其Al,O,P,Ca对应的元素分布EDS图。
- [0058] (c) 是实施例1中#Fe扫描电镜图：(A) 剥离涂层横截面SEM图 (A₁) 内层 (A₂) 外层, (B) Al,O,P,Fe对应的元素分布EDS图 (C) 铝合金样品涂层横截面SEM图及其Al,O,P,Fe对应的元素分布EDS图。
- [0059] (d) 是实施例1中#Zn扫描电镜图：(A) 剥离涂层横截面SEM图 (A₁) 内层 (A₂) 外层, (B) Al,O,P,Zn对应的元素分布EDS图 (C) 铝合金样品涂层横截面SEM图及其Al,O,P,Zn对应的元素分布EDS图。
- [0060] 图4是实施例1中涂层厚度统计图，插入的为其相应的静态接触角测试图。
- [0061] 图5是实施例1中铝合金样品的极化曲线图。
- [0062] 图6是实例1中所有样品的铝离子释放量随着时间关系变化图。
- [0063] 图7是实例1中所有样品种体外细胞培养增殖活性测试图。
- [0064] 图8是实例1中所有样品种体外细胞培养铺展扫描图：(a) #blank, (b) #Ca, (c) #Fe, (d) #Zn, (e) #Ti6Al4V, (f) #substrate。
- [0065] 图9是实例1中所有样品种体外细胞培养的21天矿化的钙盐沉积测定结果图。
- [0066] 图10 (a) 是实施例1所有样品表面体外细胞培养的成骨基因ALP的相对表达量测定结果图。
- [0067] 图10 (b) 是实施例1所有样品表面体外细胞培养的成骨基因OCN的相对表达量测定结果图。
- [0068] 图11 (a) 是实施例12所有样品抗菌效果照片。
- [0069] 图11 (b) 是实施例12所有样品对大肠杆菌 (E.coli) 抑菌效果统计图。
- [0070] 图11 (c) 实施例12所有样品对金黄色葡萄球菌 (S.aureus) 抑菌效果统计图。

具体实施方式

- [0071] 下面进一步例举实施例以详细说明本发明。同样应理解，以下实施例只用于对本发明进行进一步说明，不能理解为对本发明保护范围的限制，本领域的技术人员根据本发明的上述内容作出的一些非本质的改进和调整均属于本发明的保护范围。下述示例具体的工艺参数等也仅是合适范围中的一个示例，即本领域技术人员可以通过本文的说明做合适的范围内选择，而并非要限定于下文示例的具体数值。

[0072] 实施例1

[0073] 将长宽高为 $10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 2\text{mm}$ 的LY12铝合金(成分:3.8–4.9wt.%Cu, 1.2–1.8wt.%Mg, 0.5wt.%Fe, 0.5wt.%Ni, 0–0.9wt.%Mn, 0.25wt.%Zn, 0.1wt.%Cr, 0.15wt.%Ti, 0.5wt.%Si, 余量Al)经打磨抛光处理后,依次用丙酮、酒精、去离子水超声清洗干净,每次10min,清洗后吹干备用。样品称为#substrate。同样尺寸的钛合金(其组成含量如下,Al:5.5%–6.75%, V:3.5%–4.5%, 余量为Ti)同样清洗处理后吹干备用,称为#Ti6Al4V。

[0074] 采用微弧氧化(MAO)法,在上述铝合金表面制备氧化铝涂层,其具体的工艺参数:采用20kW的交流脉冲电压,恒流模式,实验电参数包括:电流密度($5\text{A} \cdot \text{dm}^{-2}$),频率(500Hz),占空比(12%),反应时间(8min),电解液为六偏磷酸钠溶液(主盐, $(\text{NaPO}_3)_6$,15–20g/L),所获得样品称为#blank。

[0075] 微弧氧化参数同上,电解液六偏磷酸钠中加入水合乙酸钙的试样成为#Ca,电解液六偏磷酸钠中加入水合草酸高铁铵的试样成为#Fe,电解液六偏磷酸钠中加入水合乙酸锌的试样成为#Zn。

[0076] 以上试样处理与简称参见下表

[0077] 表1

序号	是否微弧氧化	微弧氧化的电解液	简称
[0078]	否	无	#substrate
	否	无	#Ti6Al4V ¹
	是	六偏磷酸钠(主盐)	#blank
	是	六偏磷酸钠(主盐)+水合乙酸钙	#Ca
	是	六偏磷酸钠(主盐)+水合草酸高铁铵	#Fe
	是	六偏磷酸钠(主盐)+水合乙酸锌	#Zn

[0079] 注¹:钛合金只是用来做细胞实验对比实验

[0080] 实施例2

[0081] 采用X射线衍射(XRD,Bruker,D8Advance)来分析上述实施例1中所述的铝合金表面涂层的晶相结构,在 $2\theta=10^\circ$ – 80° 以 $2\theta=5^\circ/\text{min}$ 的扫描速率下收集所有数据。

[0082] 如图1所示,为了比较,还提供了未作处理的铝合金基板的XRD图谱。所有涂层样品均显示了 γ - Al_2O_3 和 α - Al_2O_3 的峰值,它们是处理微弧氧化法之后铝合金基体上涂层的常见晶相。通常,微弧氧化涂层的相分布随着涂层深度的变化而变化, α - Al_2O_3 / γ - Al_2O_3 的比例随着涂层与基底之间的界面增加而升高,这种比例直接影响材料表面的耐磨损和抗腐蚀性能(Sundararajan G,Rama Krishna L.Mechanisms underlying the formation of thick alumina coatings through the MAO coating technology.Surface and Coatings Technology,2003;167:269–77.)。由于低含量或非晶态,所有掺杂元素在XRD图中没有观察到明显的峰。

[0083] 实施例3

[0084] 对实施例1中的铝合金表面的进行X射线光电子能谱(XPS,ESCALAB 250X,Thermo Fisher,England)检测所有掺杂元素。

[0085] 图2显示了所有四个涂层样品的XPS图谱。分别对应于#blank,#Ca,#Fe,#Zn样品,

可以清楚地观察到Ca,Fe,Zn元素掺杂的峰,表明MAO方法在涂层中成功引入了人体所需的微量元素。这三种元素的结合能分别为Ca~348eV(Ca2p/3/2),Fe~710.2eV(Fe2p/3/2)和Zn~1022.5eV(Zn3p/3/2),分别与相应的金属氧化物或金属磷酸盐匹配,同时测得表面涂层元素含量百分比Ca为4.52wt%,Fe为9.26wt%,Zn为0.72wt%。

[0086] 实施例4

[0087] 通过场发射扫描电子显微镜(FESEM,Carl Zeiss,SUPRA)观察实施例1中所有微弧氧化处理的样品的表面双层涂层结构与相应的元素分布。

[0088] 图3显示了微弧氧化法在铝合金表面生成的外层是多孔致密外涂层,样品多孔表面上孔的尺寸随着不同样品而变化,内层是实心结构涂层,相应元素在涂层中均匀分布,内层涂层大概在2~6微米之间。这种外层多孔结构类似天然骨骼的微结构,作为生物植人材料有益于细胞的生长与附着,使得这种涂层具有一定的功能特点;实心的内层有利于与基地材料紧密结合同时更好保护集基体材料,防止腐蚀和铝离子析出。

[0089] 实施例5

[0090] 样品表面涂层的厚度通过涡流测厚仪和截面扫描电镜数据进行统计,每组样品随机选取十个进行统计,并给出所有样品的统计平均值。插入的为相应的样品静态接触角。

[0091] 在样品表面截面暴露下扫描电镜观察到涂层是由两个部分组成,致密的多孔层是其外层,如图4所示,实心为内层,由图4可知,内层的厚度在3~6微米,锌掺杂涂层的内层最薄,没有掺杂元素的涂层内层与钙掺杂涂层几乎厚度一致,这个内层厚度可以保护铝合金主体材料,防止铝离子大量析出,使其更耐腐蚀。接触角反映的是元素掺杂样品表面亲水性得到极大改善,暗示其生物相容性显著优于未涂层的铝合金。

[0092] 实施例6

[0093] 在电化学工作站(1470E,Solartron Metrology,UK)上测量极化曲线以确认抗腐蚀性能。在25℃下,以1mV/s的扫描速率将测试电位从-1.5~0V与饱和甘汞电极(SCE)控制。电解质由3.5wt%NaCl溶液组成。通过Tafe1外推法分析腐蚀电位(E_{corr})和腐蚀电流密度(i_{corr})。

[0094] 图5给出了极化曲线,显示铝合金样品的耐腐蚀性能。浸泡1小时后,所有样品均在3.5wt%NaCl溶液中测定。对于#substrate样品,最低腐蚀电位(E_{corr})和最高腐蚀电流密度(i_{corr})值分别约为-1.25V和500nA \cdot cm $^{-2}$,显示出最差的耐腐蚀性。经微弧氧化处理后,所有 E_{corr} 和 i_{corr} 值分别增加和减少,显示出耐腐蚀性的提高。由于涂层氧化铝陶瓷的高绝缘性,所有涂层样品的腐蚀电流密度低于20nA \cdot cm $^{-2}$,远低于未处理的#substrate样品测定值,这有利于提高耐腐蚀性。

[0095] 实施例7

[0096] 在模拟体液(SBF)检测所有样品Al³⁺的溶解情况。所用的SBF体积按下式计算:

$$Vs = Sa/10$$

[0098] 其中Vs是SBF(ml)的体积,Sa是样品的表观表面积(mm 2)。

[0099] 将样品和计算出的SBF体积放入塑料容器中,然后置于36.5℃的培养箱中。采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES,JY2000-2,Horiba,Japan)分析放置一段时间后溶解在SBF中的Al³⁺浓度。

[0100] 从图6可知,微弧氧化涂层对基底溶解Al具有非常大的抑制作用。未处理的铝合金

样品中,溶解在SBF中的Al离子的浓度在浸泡28天后显着地从约0mg/L增加到超过80mg/L,这表明Al底物被腐蚀溶解在SBF中。然而,表面有涂层的样品,Al离子的浓度与Ti6Al4V(该合金的组成含量为,Al:5.5%-6.75%,V:3.5%-4.5%,余量为Ti)样品没有明显的变化,这表明这种功能化涂层虽然是多孔结构,但抑制铝离子析出的作用是十分明显的。

[0101] 实施例8

[0102] 采用hBMSCs干细胞体外培养实验评估经上述实施例1中的所有样品表面的细胞活性。利用CCK-8试剂盒检测细胞在材料表面的增殖情况。方法如下:(1)将使用75vol.%乙醇灭菌的样品放入24孔培养板中,每孔滴加1mL密度为 1×10^4 cell/mL hBMSCS细胞悬液。(2)将细胞培养板放入5vol.%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中37℃培养。(3)细胞培养1、3和7天后,吸去原培养液,加入含有10vol.%CCK-8的新培养液,将培养板置于培养箱中培养4h后,从每孔取出100μL培养液放入96孔板中。(4)利用酶标仪测量各孔在450nm波长下的吸光度值,每个时间点每组试样分别测三次,取平均值。

[0103] 实验结果如图7所示,可见改性样品无明显细胞毒性,且可以促进干细胞增殖,掺杂铁元素的涂层表现出最佳的活性。

[0104] 实施例9

[0105] 选用hBMSCs干细胞,采用体外细胞培养实验评估经上述实施例1中的所有样品表面的细胞相容性。利用SEM观察材料表面细胞形貌,实验步骤如下:(1)将使用75vol.%乙醇灭菌的样品放入24孔培养板中,每孔滴加1mL密度为 1×10^4 cell/mL细胞悬液。(2)将细胞培养板放入5vol.%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中37℃孵化3天。(3)吸去细胞培养液,用PBS清洗样品表面后,取出样品,用2vol.%戊二醛在室温下避光固定4小时,用PBS清洗三遍。(4)用梯度酒精(30vol.%、50vol.%、75vol.%、90vol.%、95vol.%和100vol.%)对已固定的细胞进行梯度脱水处理。(5)将试样依次置于不同配比的酒精和六甲基二硅胺烷(HMDS)的混合溶液(酒精:HMDS=2:1、1:1、1:2和100vol.%HMDS)中进行干燥,处理时间各15min。试样喷金后用SEM观察样品表面的细胞形态。

[0106] 实验结果如图8所示,有涂层的样品表面细胞铺展更为平展,同时可见铁元素掺杂的涂层表面细胞生长数量更多。而钛合金和未处理的铝合金表面细胞呈现较长梭形,表明细胞老化,同时材料表面展现稀少的细胞数量。

[0107] 实施例10

[0108] 将常规培养的对数期人骨髓间充质干细胞接种在灭菌好的材料试样表面,24孔板中接种密度约为10000cell/cm²,置于含5vol.%CO₂,37℃的培养箱中培养。待细胞生长达到80-90%汇合时,改用成骨诱导培养基(含有地塞米松、抗坏血酸、β甘油磷酸钠的混合培养基)。约2-3d进行一次细胞换液,培养21d后对各组进行矿化钙盐沉积检测。方法如下:(1)细胞培养21天后,将样品移至新的24孔板内并用PBS清洗样品表面,然后向每孔中加入0.5mL 95vol.%的酒精,在室温下固定细胞1h。(2)向每孔加入40mM的茜素红溶液,在室温下对细胞进行染色10min。(3)用去离子水清洗样品表面三次。(4)向每孔加入0.5mL含10%氯化十六烷吡啶的磷酸钠溶液溶解样品表面的染料。(5)从每孔取出100μL洗脱液放入96孔板中,利用酶标仪测量各孔在540nm波长下的吸光度值。

[0109] 图9是经上述实施例1中的所有样品表面的hBMSCS干细胞21天成骨诱导培养矿化测试实验统计结果。由图9可见:掺杂锌元素的涂层表面吸光度值最大,表明锌元素掺杂的

涂层促进干细胞成骨分化能力最突出。

[0110] 实施例11

[0111] 将常规培养的对数期人骨髓间充质干细胞接种在灭菌好的材料试样表面,24孔板中接种密度约为10000cell/cm²,置于含5%CO₂,37℃的培养箱中培养。待细胞贴壁生长汇合至80%左右时,改用成骨诱导培养基(含有地塞米松、抗坏血酸、β甘油磷酸钠的混合培养基)。约2-3d进行一次细胞换液,培养后3d、7d、14d后对各组进行成骨分化基因表达检测。方法如下:(1)细胞培养3d、7d、14d后,收集细胞后提取RNA。(2)按照试剂盒(Thermo Scientific Fermentas,USA)说明进行反转录,即总体积为20μL的反应体系42度水浴一个小时。(3)按照试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明操作配制系统混合液,进行PCR反应,即反应体系总体积为20ul,94℃预变性30s,94℃变性5s,退火15s,72℃延伸10s,40个循环。由PCR反应曲线得到ct值,以β-actin为内参,采用2^{-△△ct}方法计算相对定量结果。引物序列见表2。(4)分析PCR实验结果。

[0112] 表2上述实验的引物序列(由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成)

基因	上游引物	下游引物
OCN	GCCTTTGTGTCAGC	GGACCCACATCCATAG
ALP	CCCAAAGGCTTCTTCTTG	CTGGTAGTTGTTGAGC
β-actin	TGGCACCCAGGCACAATGAA	CTAAGTCATAGTCGGCTAG

[0113] [0114] 为进一步阐述纳米结构化钛材对细胞响应的分子机理,通过反转录PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)技术对MSCs的成骨相关蛋白如骨钙蛋白(OCN)和碱性磷酸酶(ALP)在mRNA水平上的表达情况进行检测。β-actin作为RT-PCR的内参基因。由图10可知,干细胞这两种成骨基因表达量测定结果中都是锌元素掺杂的涂层样品的相对表达量最好,佐证了锌元素利于诱导成骨分化。同时元素掺杂的涂层样品表面促成骨能力都优异于未处理的铝合金样品,也高于钛合金样品的促成骨能力。

[0115] 实施例12

[0116] 将实例1中所有铝合金样品尺寸变为长宽高为50mm×50mm×2mm的LY12铝合金,微弧氧化工艺同实例1,样品简称与表1相同。

[0117] 实施例13

[0118] 选用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,S.aureus,ATCC25923)和大肠杆菌(*Escherichia coli*,E.coli,ATCC25922),采用抗菌实验评估经上述实施例12中铝合金表面涂层的抗菌性。具体步骤如下:1)将使用75vol.%乙醇灭菌的样品置于培养板中,吸取400μL的5×10⁵cfu·mL⁻¹E.coli和S.aureus菌液分别滴于测试样品表面,并在测试接种液上覆盖一张40mm×40mm的薄膜后轻轻压下使接种液散开但不泄露到膜边缘以外;2)保持湿度大于90wt.%,置于36.5℃厌氧恒温箱中培养24h;3)以400μL无菌PBS将材料表面菌液吹打均匀,并稀释10⁻⁵;4)取稀释后的菌液100μL接种于营养琼脂培养皿(TSB琼脂板用于培养S.aureus,LB琼脂板用于培养E.coli);5)涂板后再置于36.5℃厌氧恒温箱培养24h,拍照并记录存活菌落数,按照以下公式计算抗菌率:

$$[0119] \text{ 抗菌率} = \frac{B - A}{A} \times 100\%$$

[0120] 式中:A为对照组#substrate菌落数,B为实验组(有涂层组)表面的菌落数。

[0121] 图11分别是上述实例12中样品表面的抗菌实验照片和及相应统计学结果。由图11可知:结果表明#Blank和#Ca修饰的铝合金材料抑菌效果较差,#Fe修饰的材料对E.coli、S.aureus均具有一定程度的抑菌效果,其中#Zn修饰的材料对E.coli,S.aureus的抑菌效果明显,对E.coli的抑菌率为 $99.5 \pm 0.56\%$,对S.aureus的抑菌率为 $98.77 \pm 0.52\%$ 。

[0122] 本发明已经实验证实,铝合金表面的涂层均匀致密,XRD证实确为三氧化二铝(见图1),并且掺杂了不同元素(见图2),钙元素($\sim 348.1\text{eV}$)、铁元素($\sim 710\text{eV}$)锌元素($\sim 1022.5\text{eV}$)。在扫描电镜下可见致密的多孔结构(见图3),这种涂层深入观察发现是双层涂层,内层实心涂层厚度在3-6微米(见图4)。电化学表征进一步说明这种涂层有利于材料耐腐蚀(见图5)。在模拟体液(SBF)中进行了铝离子析出的ICP测试,很明显这种微弧氧化制备的涂层对底物溶解铝离子的抑制作用(见图6),解决了铝合金在医用领域的应用难题。还通过体外成骨细胞培养来比较不同涂层成骨细胞相容性。研究结果表明,干细胞在试样表面的增殖(图7)、附着(图8)、矿化半定量钙盐沉积测定结果(图9)和成骨分化能力(图10)与没有涂层或者没有元素掺杂的涂层相比均有明显提高。另外体外细菌实验也显示这种提高(见图11),元素掺杂的涂层抑菌性都有提高,尤其是掺杂锌元素的氧化铝涂层。这些实验数据,表明通过微弧氧化制备的氧化铝双层涂层的生物相容性良好,无论是成骨还是抑菌效果均优于普通的钛合金材料。

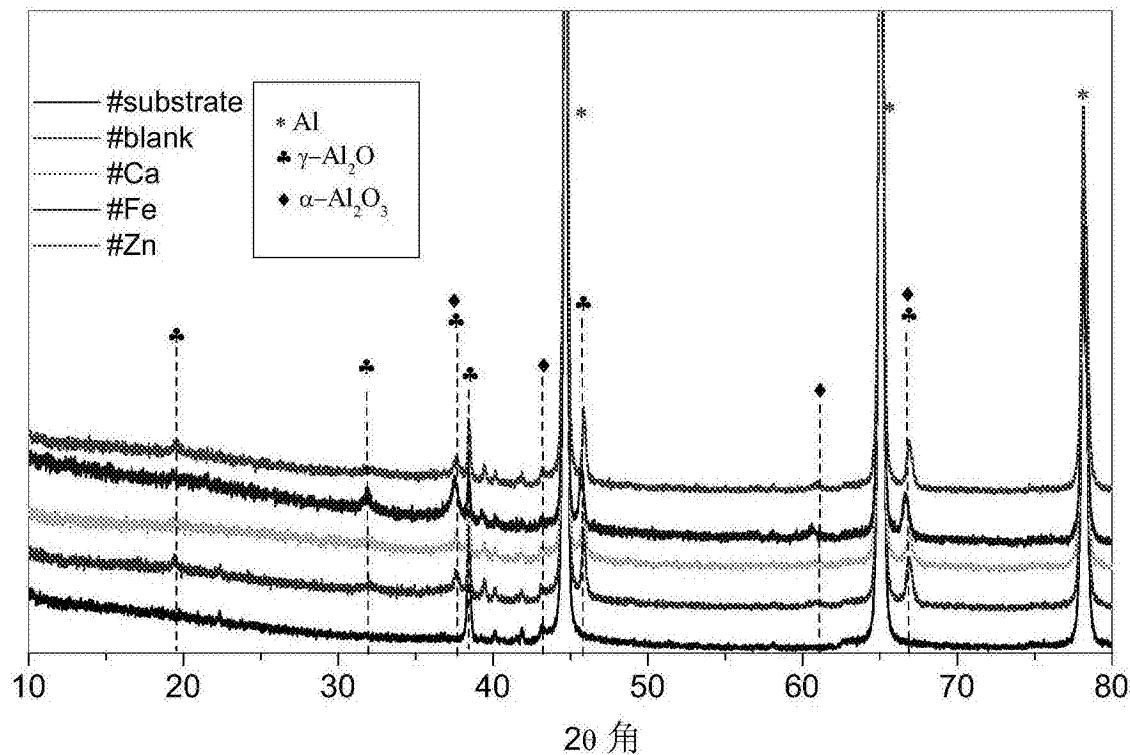


图1

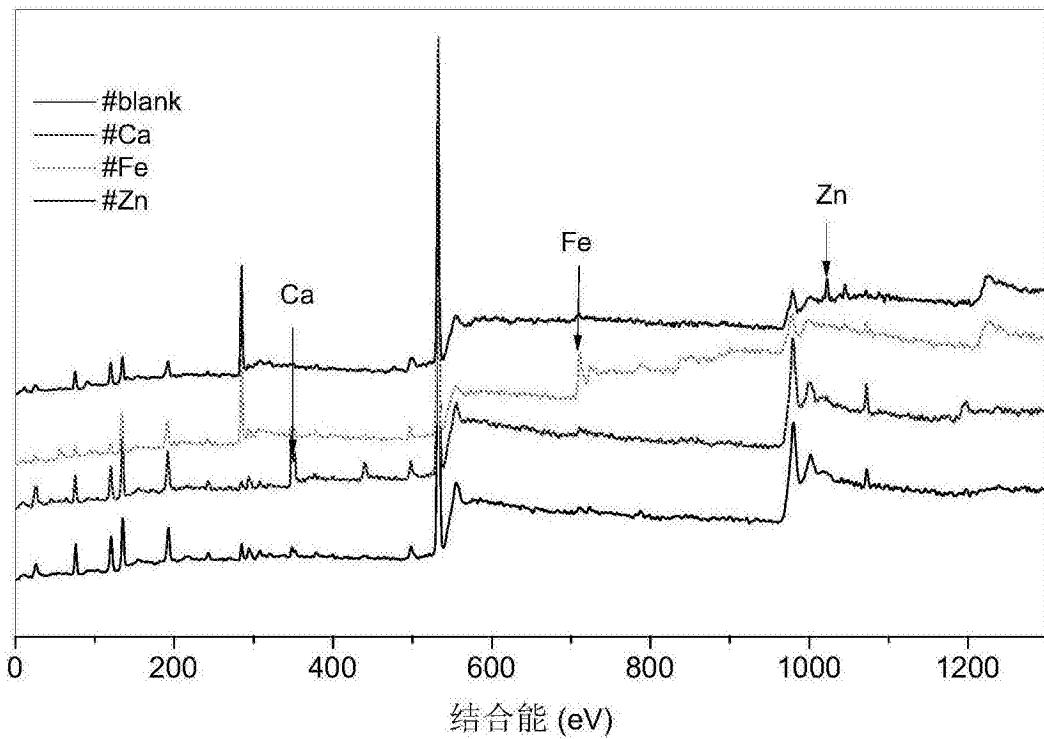


图2

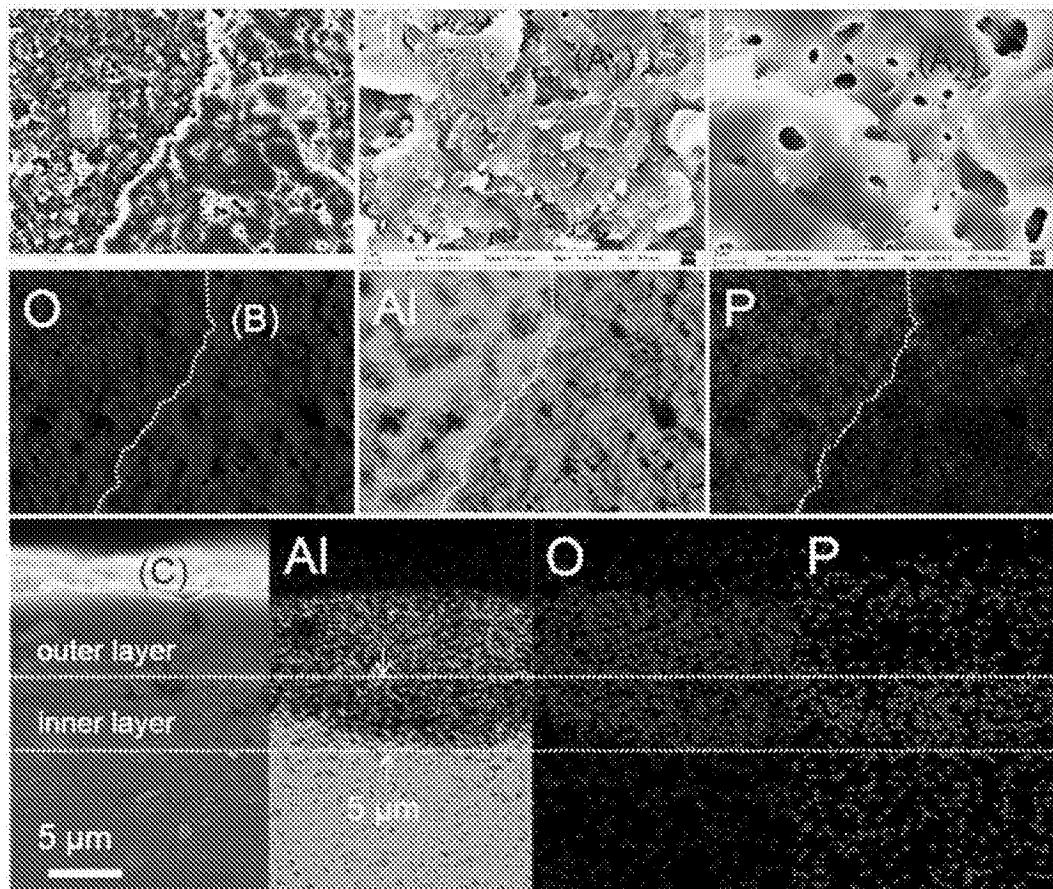


图3 (a)

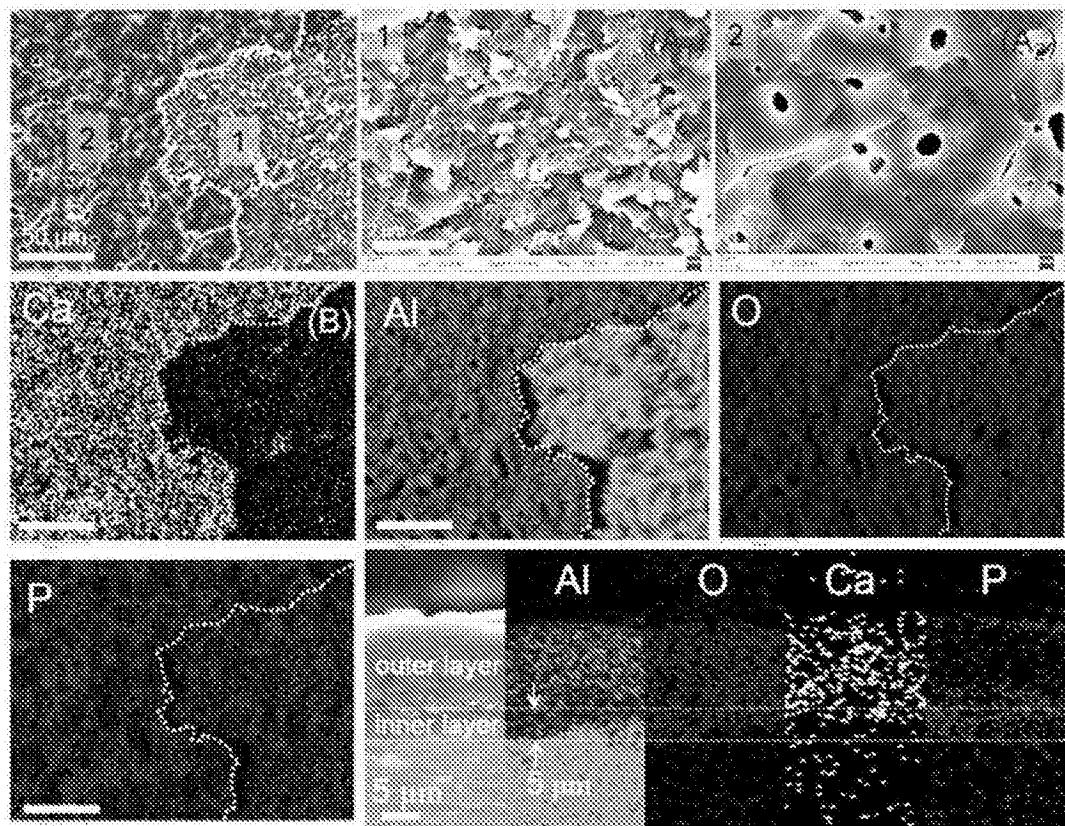


图3 (b)

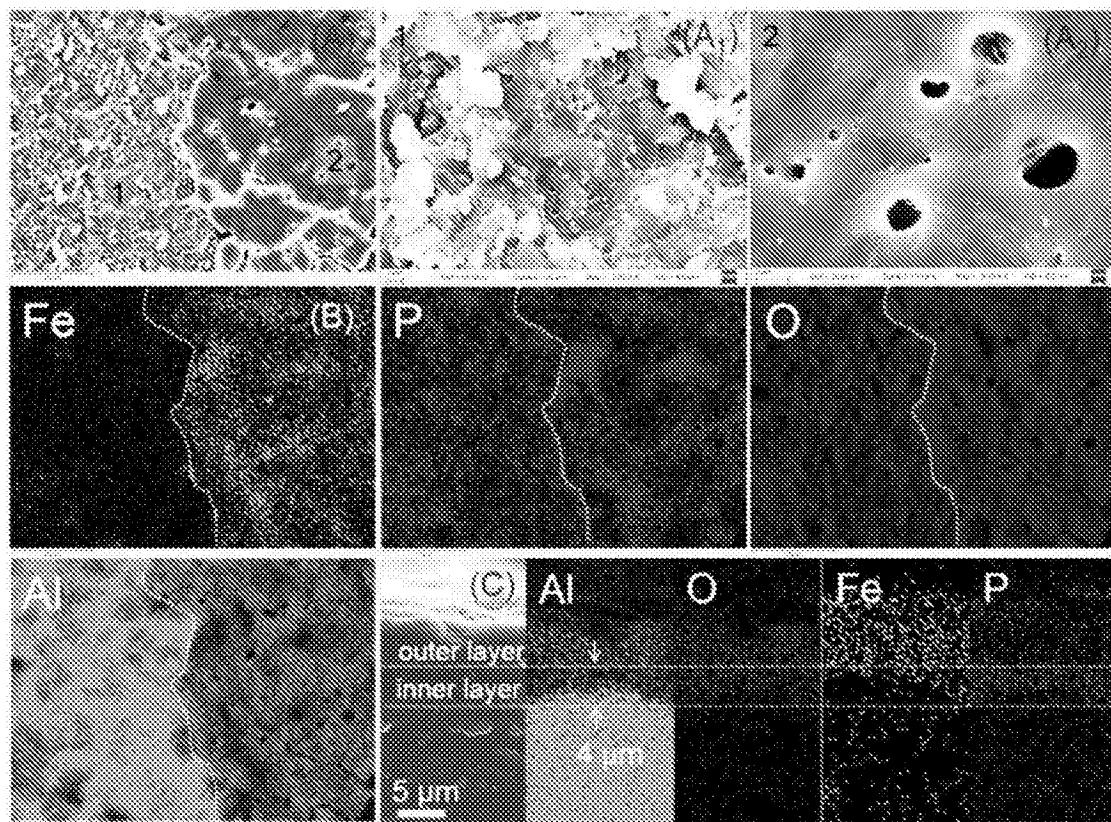


图3 (c)

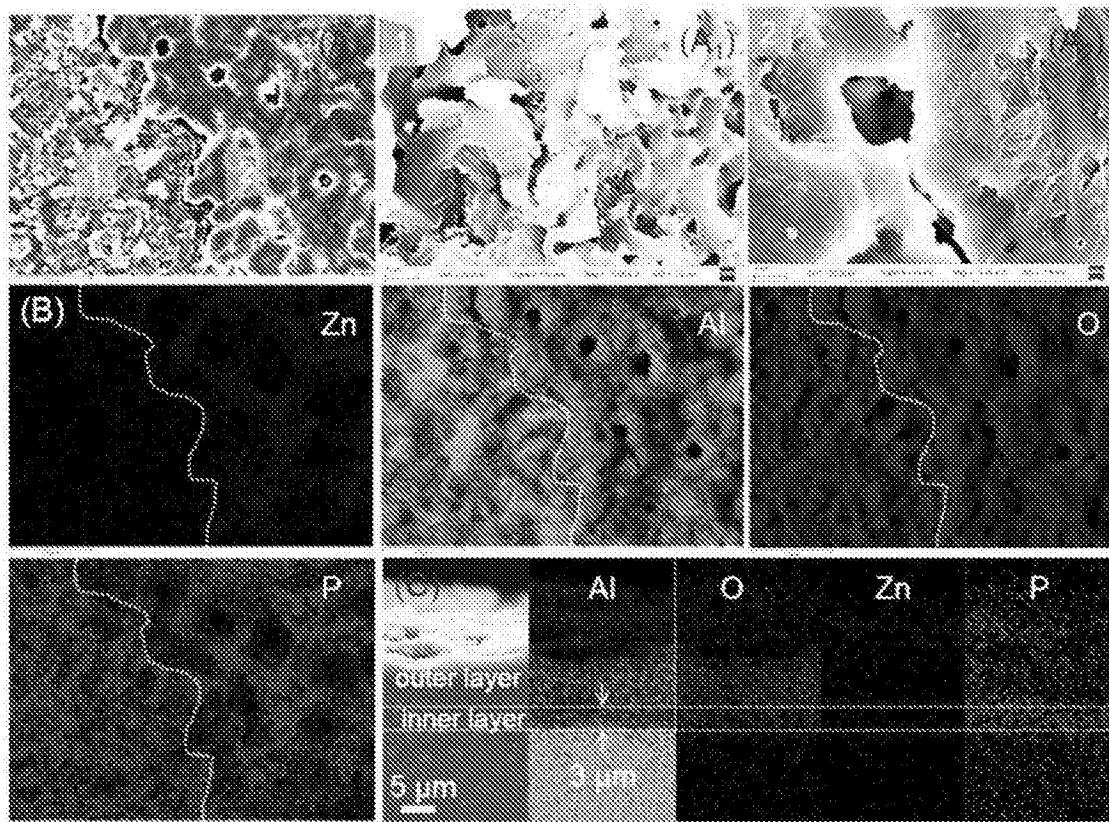


图3 (d)

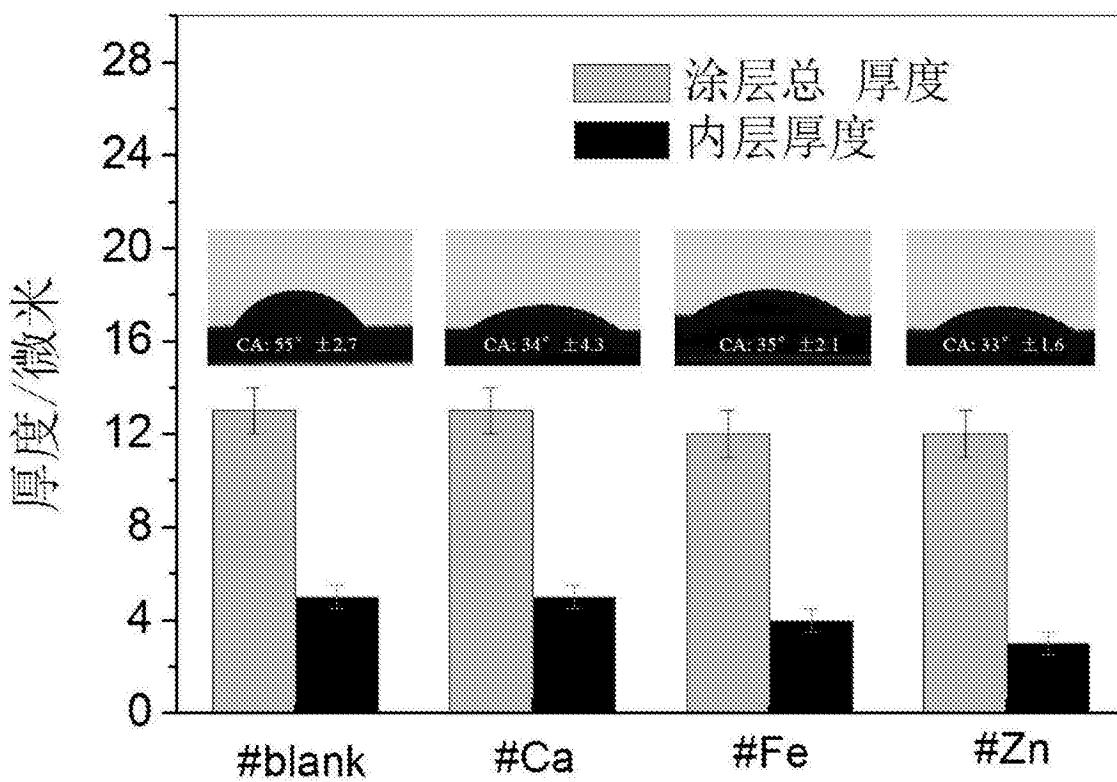


图4

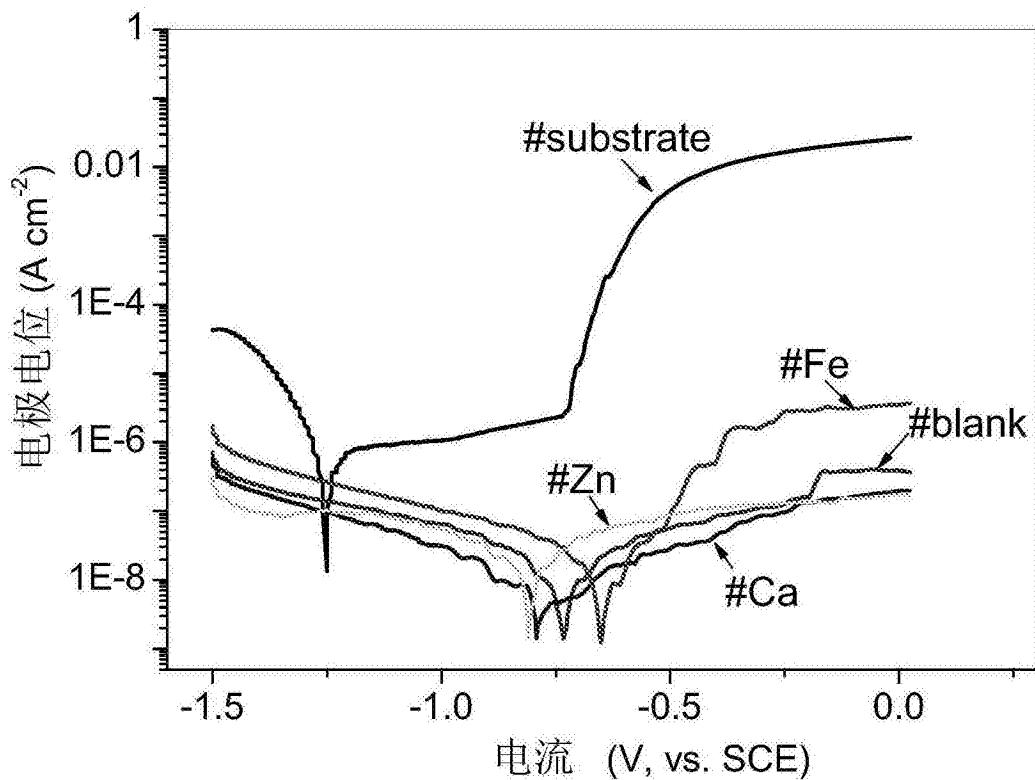


图5

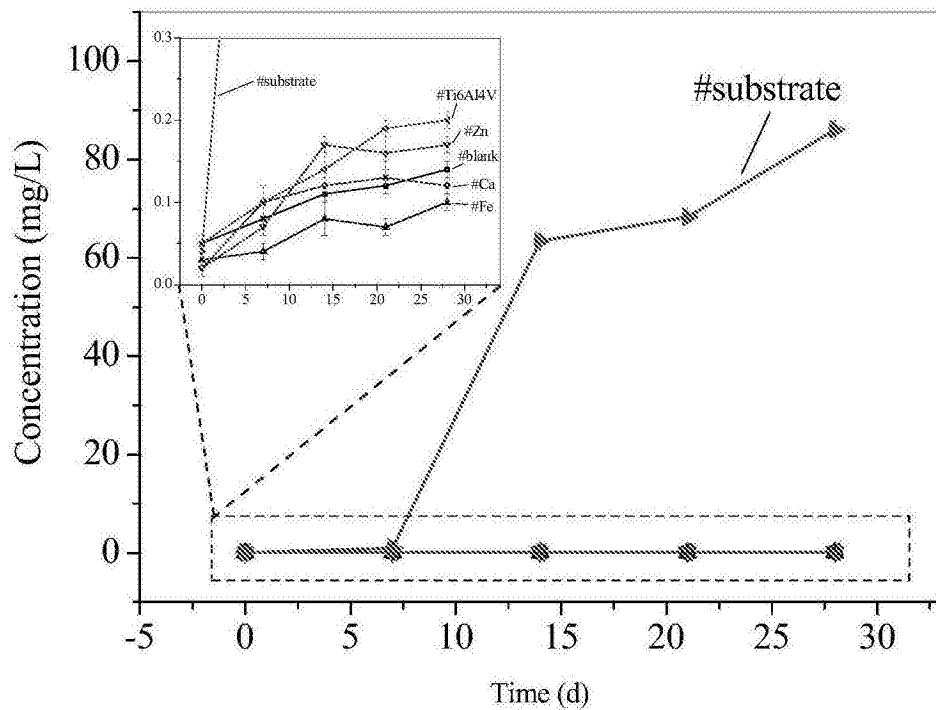


图6

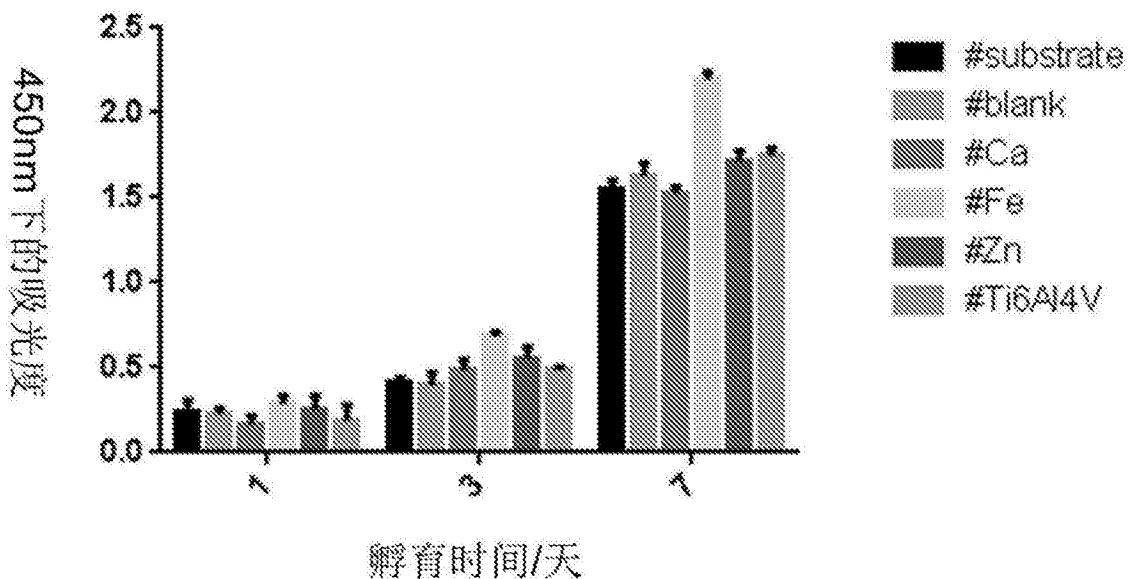


图7

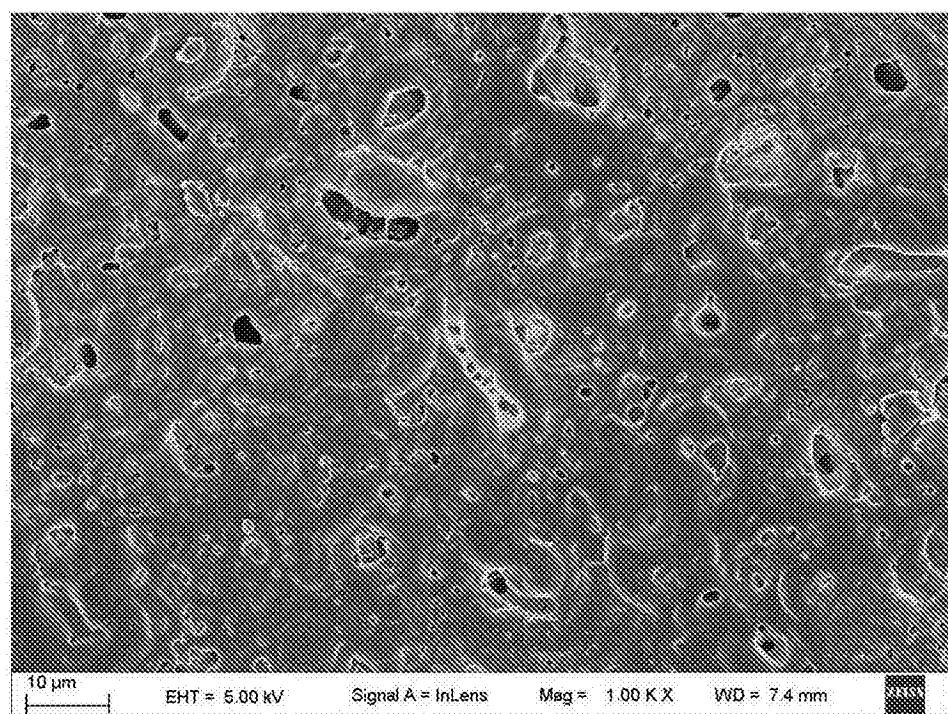


图8 (a)

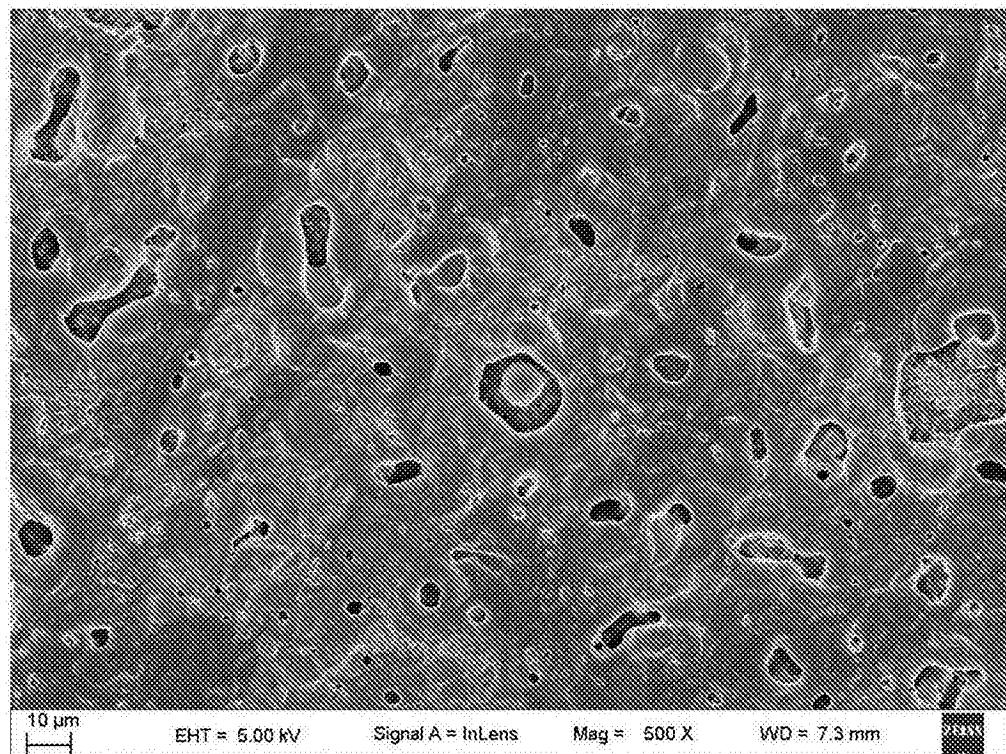


图8 (b)

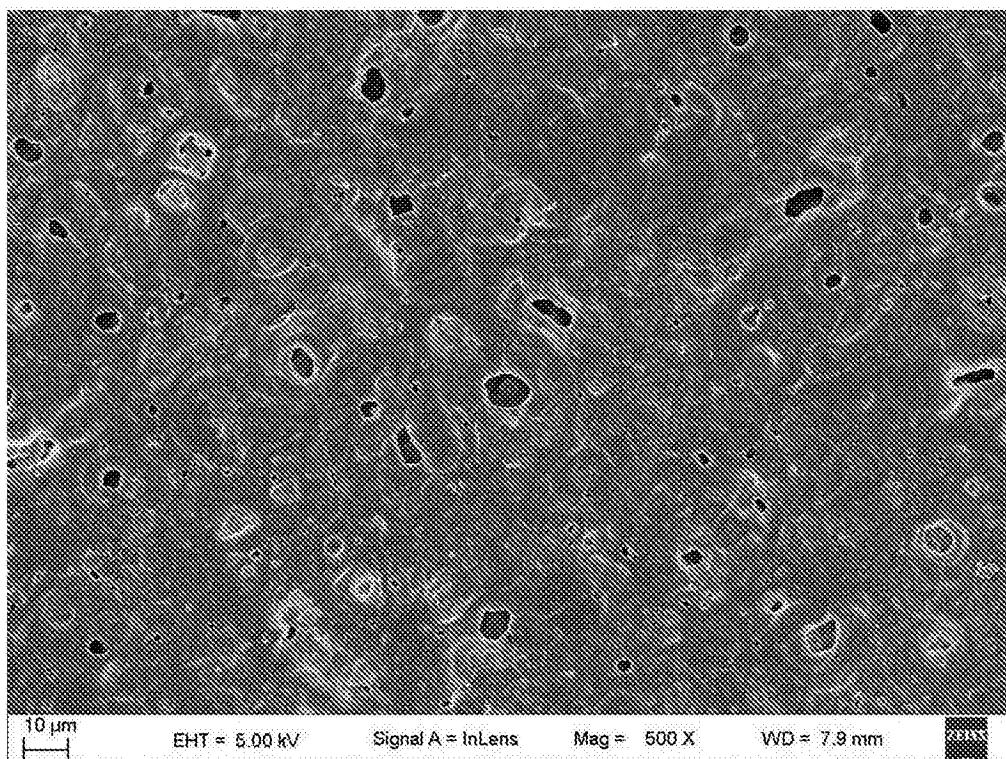


图8 (c)

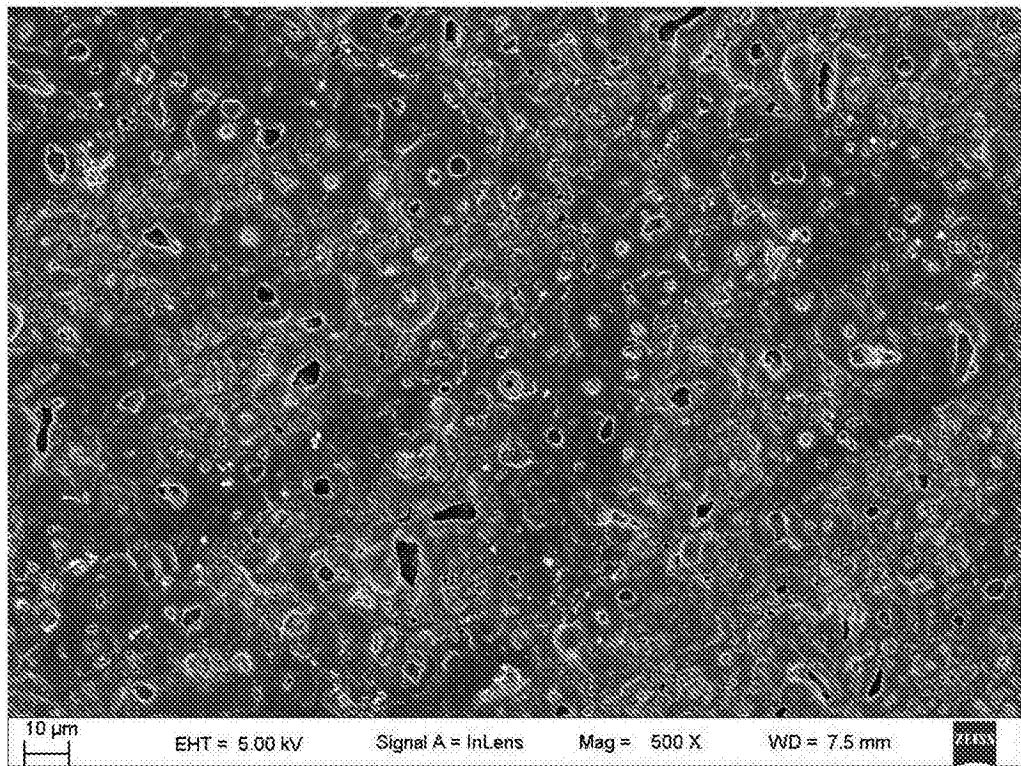


图8 (d)

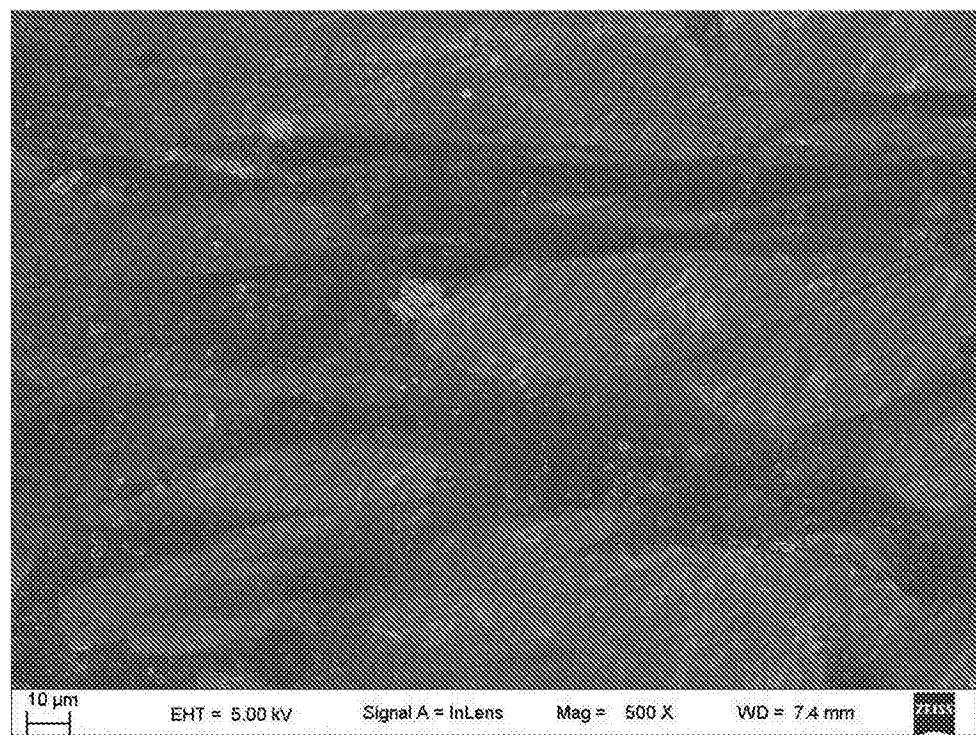


图8 (e)

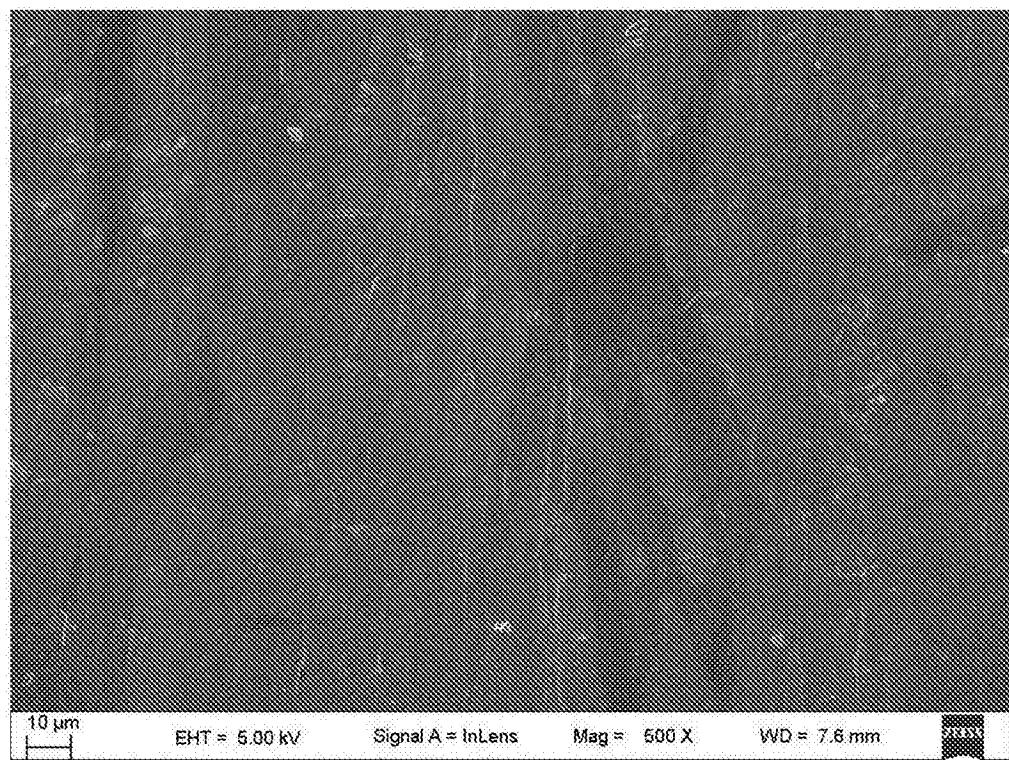


图8 (f)

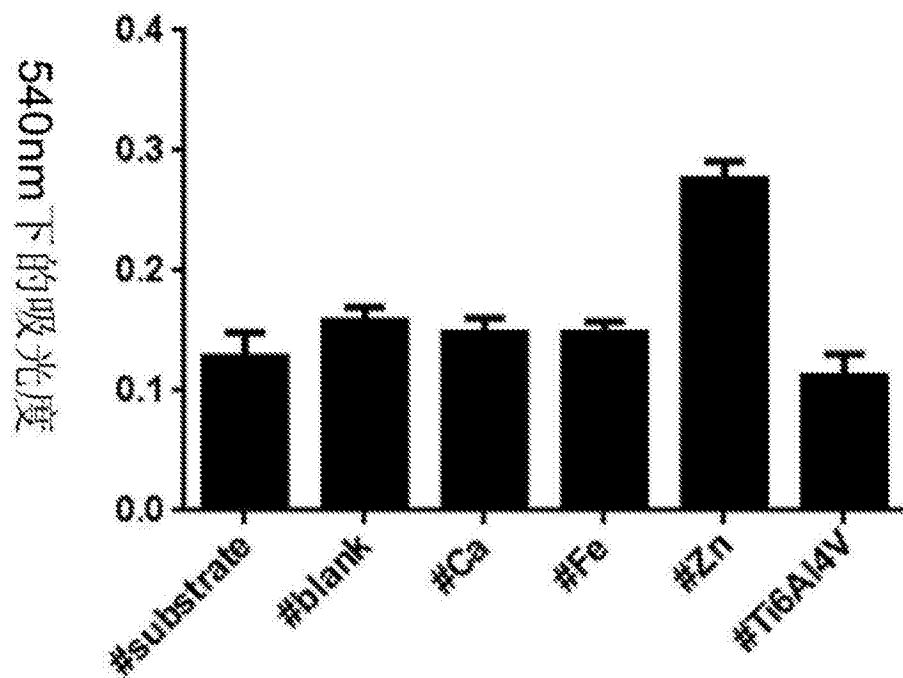


图9

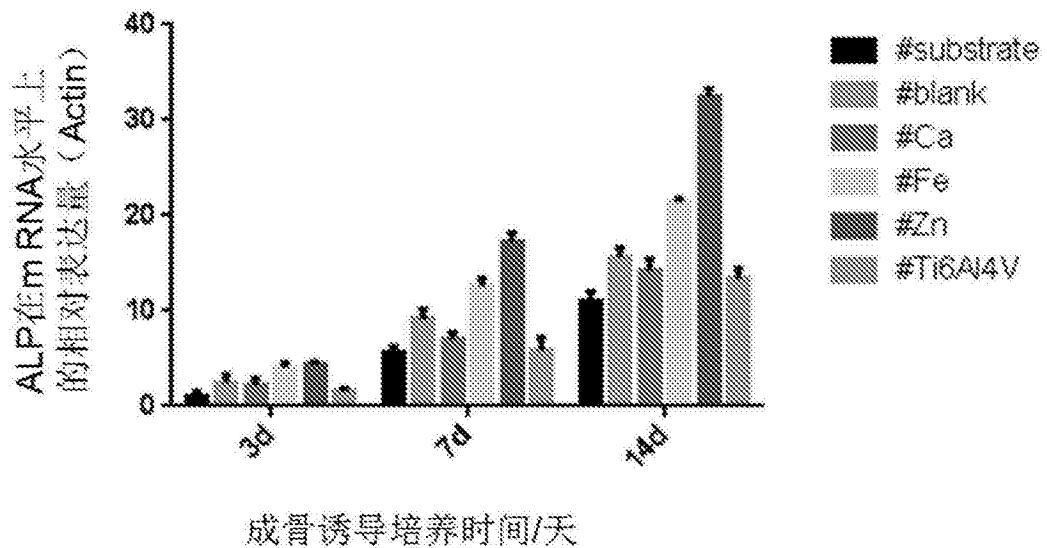


图10 (a)

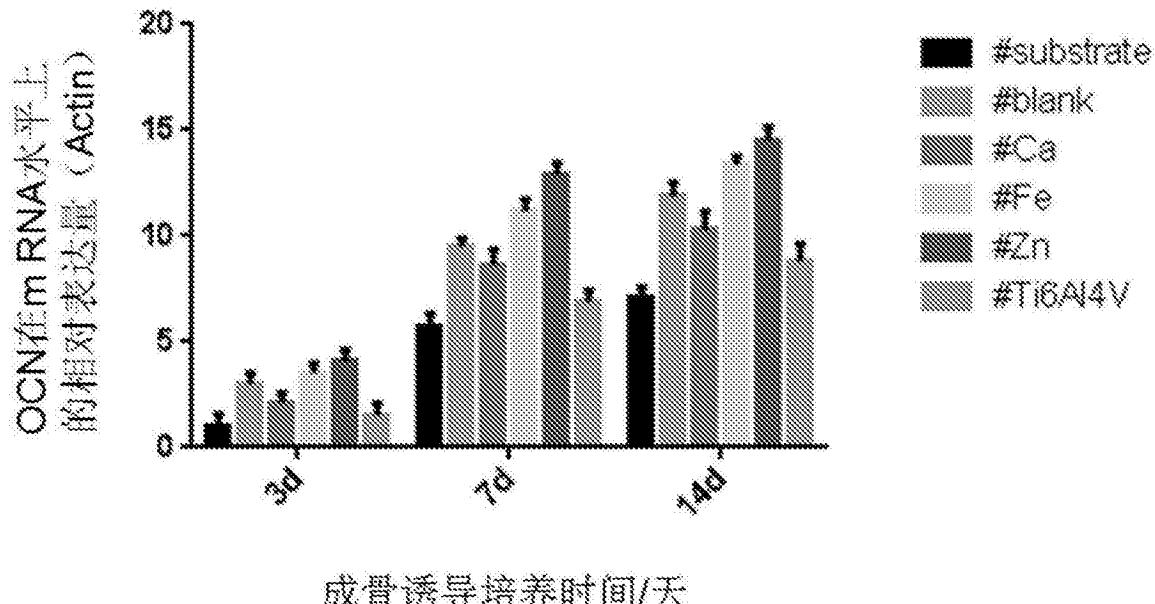


图10 (b)

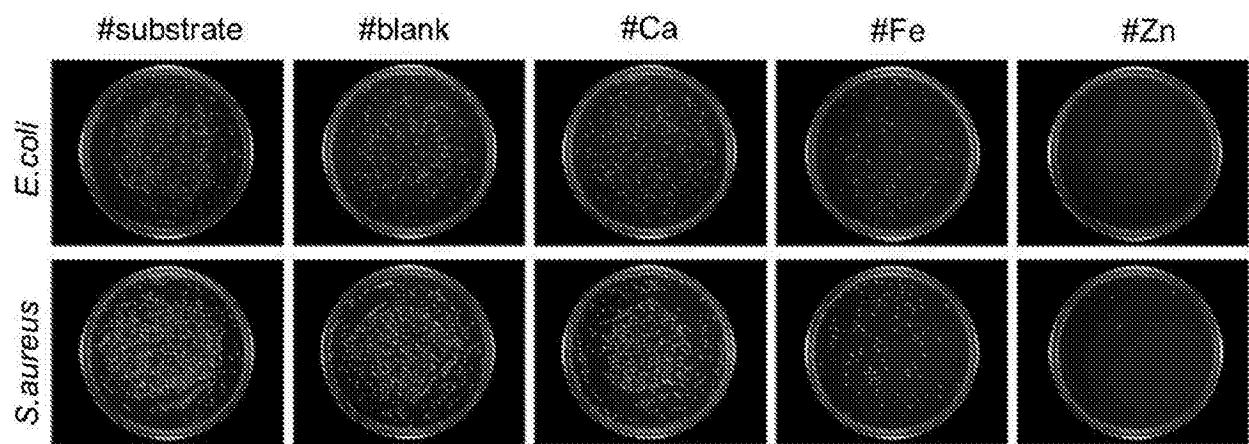


图11 (a)

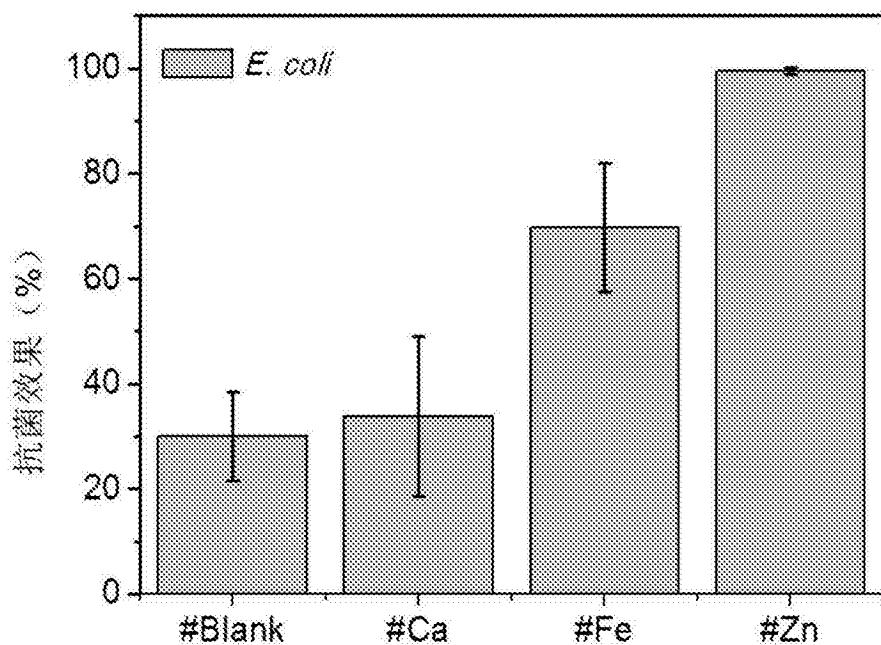


图11 (b)

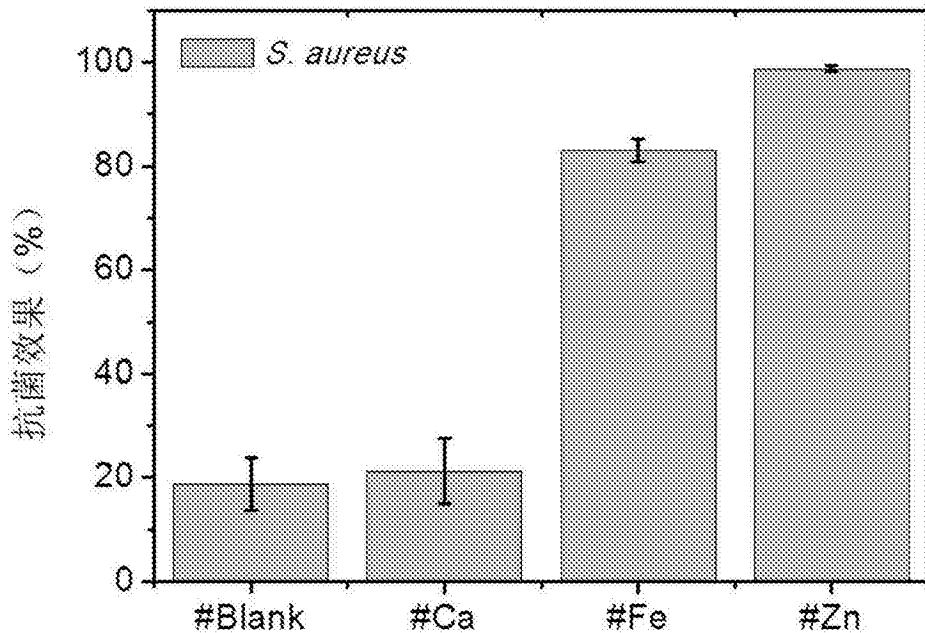


图11 (c)