



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116117603 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 16

(21) 申请号 202310033804.0

(22) 申请日 2023.01.10

(71) 申请人 武汉理工大学青岛研究院  
地址 266200 山东省青岛市即墨区蓝谷创  
业中心一期3号楼A座

(72) 发明人 尹飞 易于煊

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理  
事务所(普通合伙) 42231  
专利代理师 张杰

(51) Int. Cl.

B24B 1/04 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

B24B 1/00 (2006.01)

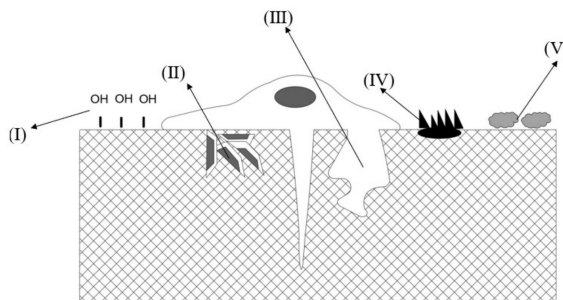
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种均质稳定纳米金属细胞培养界面及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,包括以下步骤:S1、确定金属材料;S2、利用高频超声波信号和脉冲电流对所述金属材料进行低塑性微动对磨抛光,使得金属材料表面形成纳米结构层;S3、对表面形成纳米结构层的所述金属材料进行磨制,分离得到纳米结构层,即为所述纳米金属细胞培养界面。本发明通过耦合超频滚压与大电流处理及无损表面提取技术,不但工艺成本低,减少浪费,而且使用金属材料替代某些有毒化学试剂,构造了一种结构均质稳定的具有“网状”纳米结构的细胞基质界面,这种界面结构能有效改善细胞体外繁殖的效率,增强细胞的综合生物功能。



1. 一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、确定金属材料;

S2、利用高频超声波信号和脉冲电流对所述金属材料进行低塑性微动对磨抛光,使得金属材料表面形成纳米结构层;

S3、对表面形成纳米结构层的所述金属材料进行磨制,分离得到纳米结构层,即为所述纳米金属细胞培养界面。

2. 根据权利要求1所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,步骤S1所述金属材料为316L不锈钢板,厚度为3mm,尺寸为 $50 \times 50 \text{mm}^2$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,步骤S2在等离子气溶胶介质中对所述金属材料进行对磨抛光。

4. 根据权利要求1所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,步骤S2利用点焊电脉冲发生装置产生所述脉冲电流,所述点焊电脉冲发生装置的单个脉冲电流峰值大小,满足以下公式:

$$I_p^2 = A^2 \times \left( \frac{\rho c}{\sigma} \right) \times \left( \frac{dT}{dt} \right)$$

式中, $I_p$ 是通过金属材料的电流, $A$ 是材料的横截面积, $\rho$ 是材料密度, $c$ 是比热容, $\sigma$ 是电阻率, $\frac{dT}{dt}$ 是加热速率。

5. 根据权利要求1所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,步骤S2所述高频超声波信号的超频阈值为20KHz,维持时间占对磨抛光总时间的80%,休止时间占对磨抛光总时间的20%。

6. 根据权利要求1所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,步骤S3利用自动磨制机自下而上对表面形成纳米结构层的所述金属材料进行磨制。

7. 根据权利要求6所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,步骤S3磨制过程中,所述自动磨制机的磨损轨迹中心保持 $1.59 \times 10^{-3} \text{m/s}$ 的恒定速度。

8. 根据权利要求6所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,步骤S3中磨制时间的确定方法为:由金属材料的原始厚度 $D$ 减去磨损厚度 $D_L$ 得到剩余厚度 $D_R$ ,当剩余厚度 $D_R < 100 \mu\text{m}$ 时停止研磨;或当摩擦系数稳定提升至 $0.35 < \mu < 0.4$ 范围时停止研磨。

9. 根据权利要求8所述的一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,其特征在于,根据金属材料的磨损体积 $V_w$ 和磨损表面积 $S_e$ 得到所述磨损厚度 $D_L$ ,其中所述金属材料的磨损体积和磨损表面积分别由如下公式计算得到:

$$V_w = 2\pi R \left[ r^2 \sin^{-1} \left( \frac{c}{2r} \right) - \left( \frac{c}{4} \right) (4r^2 - c^2)^{0.5} \right]$$

$$S_e = c \times c'$$

式中, $V_w$ 是磨损体积( $\text{mm}^3$ ); $S_e$ 是磨损表面积( $\text{mm}^2$ ); $R$ 和 $r$ 分别是磨损轨迹和对磨球销的半径; $c$ 、 $c'$ 分别是磨损轨迹的宽度和长度。

10. 根据权利要求1~9任一项所述的均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法制备得到的纳米金属细胞培养界面。

## 一种均质稳定纳米金属细胞培养界面及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及金属纳米材料加工制备与生物工程生物细胞的体外培养应用领域,具体涉及一种均质稳定纳米金属细胞培养界面及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 目前能够应用于生物化学以及生物医学领域的纳米材料,其制备方式争议很大。研磨或者撞击蚀刻法等物理方式制备纳米材料需要非常复杂的操作工序以及精密的仪器,不仅费时、灵敏度低且所需成本高,不能满足日常实验以及工业生产需求。化学法制备纳米材料需用大量还原剂甚至包含某些有毒化学试剂,不仅浪费材料,制备过程中也容易污染环境,而且这些试剂对动、植物乃至人类的生产生活具有一定潜在危害。与生物学相结合来制备这些具有特殊性能的纳米材料,成本低,减少浪费还能使制备方法更加方便简单,在制备过程中使用含有大量活性位点和还原基团的生物活性材料替代某些有毒化学试剂作为还原剂、封端剂和稳定剂,已经是广大科研工作者的研究热点。

[0003] 在生物学上,纳米级边界的高密度将促进蛋白质吸附,这是人类成骨细胞生物学功能的标志,也是生物医学设备接触生理环境时的第一步。众所周知,成骨细胞的功能可以通过纳米级羽毛进行调节,如纳米柱、纳米管、纳米凹槽等。同时基质的表面性质,如微/纳米级的形貌、晶粒大小和刚度,在介导细胞活动方面发挥着重要作用,并对生物医学植入物的良好和快速骨整合产生重大影响。一些研究指出,具有纳米颗粒/超细颗粒的材料表面显示出增强的生物性能,这种增强归因于由高密度晶界而增加的表面能。

[0004] 材料表面的形态特征是影响种植体骨整合效果的重要因素,适当粗糙表面较之光滑表面更有利于骨整合的形成。目前应用于临床的种植体表面多具有微米级形貌,有利于细胞成骨向分化,但可能抑制成骨细胞增殖,影响种植体表面成骨速度。这些纳米级形貌或单独存在,或与微米级形貌形成复合结构,都会对组织细胞的生物学行为产生正向的激励和引导,对材料表面的细胞培养具有促进作用。金属纳米材料在的生物化学制备及在生物医学领域的应用中存在一些局限性或缺点。限制之一是工艺不成熟:大多制备方法对生物纳米表面能的调控难以克服,制备得到的生物结构稳定性差,同时大面积生产纳米材料的成本和时间相当昂贵。这些方法的另一个局限性是无法同时实现其表面的良好机械和生物性能。更糟糕的是,使用化学方法(如高浓度氢氟酸蚀刻)来修饰细胞基底界面会破坏基质材料的结构,并将不需要的离子引入表面,这对组织有害,并降低生物植入材料的疲劳寿命、腐蚀和耐磨性。此外,这些方法在培养人类成骨细胞的界面上的细胞数量和细胞覆盖面积难以达到生物学要求的较高水平,难以在体外同时实现更好的附着、更广泛的扩散和更高的增殖率,最终使生物学功能的有效性大打折扣。

### 发明内容

[0005] 针对以上现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种均质稳定纳米金属细胞培养界面及其制备方法。该方法通过耦合超频滚压与大电流处理及无损表面提取技术,不但

工艺成本低,减少浪费,而且使用金属材料替代某些有毒化学试剂,构造了一种结构均质稳定的具有“网状”纳米结构的细胞基质界面,这种界面结构能有效改善细胞体外繁殖的效率,增强细胞的综合生物功能。

[0006] 为实现上述目的,本发明通过如下技术方案实现:

[0007] 一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,包括以下步骤:

[0008] S1、确定金属材料;

[0009] S2、利用高频超声波信号和脉冲电流对金属材料进行低塑性微动对磨抛光,使得金属材料表面形成纳米结构层;

[0010] S3、对表面形成纳米结构层的金属材料进行磨制,分离得到纳米结构层,即为纳米金属细胞培养界面。

[0011] 优选的,步骤S1中金属材料为316L不锈钢板,厚度为3mm,尺寸为 $50 \times 50 \text{mm}^2$ 。

[0012] 优选的,步骤S2在等离子气溶胶介质中对金属材料进行对磨抛光。通过在等离子气溶胶介质中对板材表面进行无极超频低塑性微动撞击,致使材料发生间歇摩擦腐蚀加速劣化过程。

[0013] 优选的,步骤S2利用点焊电脉冲发生装置产生所述脉冲电流,点焊电脉冲发生装置的单个脉冲电流峰值大小,满足以下公式:

$$[0014] \quad I_p^2 = A^2 \times \left( \frac{\rho c}{\sigma} \right) \times \left( \frac{dT}{dt} \right)$$

[0015] 式中, $I_p$ 是通过金属材料的电流,A是材料的横截面积, $\rho$ 是材料密度,c是比热容, $\sigma$ 是电阻率, $\frac{dT}{dt}$ 是加热速率。

[0016] 优选的,步骤S2脉冲电流的通电时间为1s。

[0017] 优选的,步骤S2高频超声波信号的超频阈值为20KHz,维持时间占对磨抛光总时间的80%,休止时间占对磨抛光总时间的20%。

[0018] 优选的,步骤S3利用带有摩擦系数检测功能的自动磨制机自下而上对表面形成纳米结构层的金属材料进行磨制。

[0019] 优选的,磨制过程中,自动磨样机的磨损轨迹中心保持 $1.59 \times 10^{-3} \text{m/s}$ 的恒定速度。

[0020] 优选的,步骤S3中磨制时间的确定方法为:由金属材料的原始厚度D减去磨损厚度 $D_L$ 得到剩余厚度 $D_R$ ,当剩余厚度 $D_R < 100$ 时停止研磨;或当摩擦系数稳定提升至 $0.35 < \mu < 0.4$ 范围时停止研磨。

[0021] 优选的,根据金属材料的磨损体积 $V_w$ 和磨损表面积 $S_e$ 得到磨损厚度 $D_L$ ,其中金属材料的磨损体积和磨损表面积分别由如下公式计算得到:

$$[0022] \quad V_w = 2\pi R \left[ r^2 \sin^{-1} \left( \frac{c}{2r} \right) - \left( \frac{c}{4} \right) (4r^2 - c^2)^{0.5} \right]$$

$$[0023] \quad S_e = c \times c'$$

[0024] 式中, $V_w$ 是磨损体积( $\text{mm}^3$ ); $S_e$ 是磨损表面积( $\text{mm}^2$ );R和r分别是磨损轨迹和对磨球的半径;c、c'分别是磨损轨迹的宽度和长度。

[0025] 本发明还提供一种由上述制备方法制备得到的纳米金属细胞培养界面。

[0026] 本发明提出的一种均质稳定的纳米金属细胞培养界面的制备方法,与传统生物培

养界面的“表面形貌修饰”方法不同的是,基于金属材料,首先利用高密度和频率的超声能量场和脉冲电流对金属材料进行低塑性微动对磨抛光,使得材料表面均质化纳米化,然后利用自动磨样机通过磨损的方式自下往上对材料进行研磨,调控残余厚度,处理得到的纳米晶网状层的精细程度和表面完整性质量较高,无损表面提取技术避免电火花线切割产生的局部高温对其造成腐蚀及晶粒受热长大等不可逆性损伤,同时通过体外培养的对照实验和检测及统计验证了该基质的高效性及可靠性。

[0027] 本发明的有益效果是:

[0028] 本发明提供了一种均质稳定纳米金属细胞培养界面的制备方法,通过耦合超频滚压与大电流处理及无损表面提取技术,不但工艺成本低,减少浪费,而且使用金属材料替代某些有毒化学试剂,构造了一种结构均质稳定的具有“网状”纳米结构的细胞基质界面,这种界面结构能有效改善细胞体外繁殖的效率,增强细胞的综合生物功能。

[0029] 本发明所设计的方法能实现对加工出的基质的有效培养面积以及厚度进行定量计算,从而为获得稳定高效、均质、工作可靠的细胞培养界面提供可能。

## 附图说明

[0030] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例的附图作简单地介绍。

[0031] 图1为本发明制备均质稳定的纳米金属细胞培养界面的装置图;

[0032] 图2为本发明耦合了超声波能场与高压电场对金属材料进行低塑性微动对磨抛光示意图;

[0033] 图3为金属材料经低塑性微动对磨抛光后的结构示意图;

[0034] 图4为本发明对金属材料进行磨制的自动磨样机装置图;

[0035] 图5为研磨过程中摩擦系数随时间的变化图;

[0036] 图6为细胞处于本发明制备的超细纳米金属表面层培养时的体外理化环境及在纳米金属基表面的细胞引导过程;

[0037] 图7为人骨细胞在两种培养基质上培养2、4、6小时后细胞覆盖率和细胞密度;

[0038] 图8为人骨细胞在两种培养基质上分别增殖培养12小时后的细胞繁殖情况。

## 具体实施方式

[0039] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,均属于本发明保护的范围。

[0040] 实施例1

[0041] S1、确定金属材料。

[0042] 本实施例使用的金属材料是316L不锈钢板,厚度D为3mm,尺寸为 $50 \times 50\text{mm}^2$ 。

[0043] S2、利用高频超声波信号和脉冲电流对金属材料进行低塑性微动对磨抛光,使得金属材料表面形成纳米结构层。

[0044] 图1为本实施例制备均质稳定的纳米金属细胞培养界面的装置图,包括浸泡有等

离子气溶胶介质的凸台1;低塑性抛光对磨球2;点焊电脉冲发生装置3;驱动对磨球产生微动往返震动的超声发生器4;用于观测电涡流的焦耳热效应的量子波动白光干涉热成像仪5;用于将超音波相位差角放大后传递至对磨球的超频滚压变幅频贯轴连杆6。

[0045] 具体操作步骤如下:将 $50 \times 50 \times 3\text{mm}^3$ 的316L钢板固定在反应池内,即凸台1和低塑性抛光对磨球2之间的反应池凹面上,以抛光和清洁的 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 球(6mm)作为对磨材料,凹槽中加入质量分数为3.5%的NaCl溶液,增强导电性及材料的摩擦腐蚀加速劣化过程。调整点焊电脉冲发生装置3,给样品通透电磁除颤前确定通电时间 $t_d$ 和单个脉冲电流峰值大小 $I_p$ 。当大电流对导体进行自适应烧结时,单个脉冲电流峰值大小 $I_p$ 主要由材料的加热速率确定,并满足下式:

$$[0046] \quad I_p^2 = A^2 \times \left(\frac{\rho c}{\sigma}\right) \times \left(\frac{dT}{dt}\right)$$

[0047] 式中, $I_p$ 是通过金属材料的电流, $A$ 是材料的横截面积, $\rho$ 是材料密度, $c$ 是比热容, $\sigma$ 是电阻率, $\frac{dT}{dt}$ 是加热速率。

[0048] 大体量的电热循环过程有利于烧结颈部生长和增强颗粒的连接强度,因为加热过程的连续迭代产生大量焦耳热。样品获得了更多的焦耳加热量,通过循环电热效应比恒定烧结提供更多的能量和电塑性附加效果,致密化过程显著增强。因此,在电热循环的作用下,材料因焦耳热导致温度升高 $\Delta T$ 的计算公式为:

$$[0049] \quad \Delta T = \frac{\int_0^{t_d} \rho_e j^2 (d) dt}{cd}$$

[0050] 式中: $\rho_e$ 为材料的电阻率; $j$ 为电流密度; $t_d$ 为通电时间; $c$ 为材料的比热容, $d$ 为材料的密度。

[0051] 本发明设置 $\Delta T$ 不超过国标GB150-98推荐的最高使用温度 $450^\circ\text{C}$ ,避免所获得基质的强度及抗氧化性下降。本实施例通过计算设置通电时间 $t_d$ 为1s,随后启动点焊电脉冲发生装置3,通过量子波动白光干涉热成像仪5观测样品表面温度处于 $450^\circ\text{C}$ 以内,待通电1s使材料的内部应力释放,均质化并保存有一定的电致塑性后,启动超声发生器4,设定其超频阈值为20KHz,维持时间为800ms,休止时间 $t_{\text{step}}$ 为200ms;最后启动超频滚压变幅频贯轴连杆6,使得超音波相位差角放大后传递至对磨球,从而通过耦合超声波能场与高压电场实现对板材表面进行无极超频低塑性微动撞击(如图2所示),致使材料发生间歇摩擦腐蚀加速劣化过程,进而在金属材料表面制造一层强塑性匹配的纳米结构层。

[0052] S3、对超声波信号和脉冲电流处理后的金属材料进行观测统计。

[0053] 首先取S2中处理得到的316L不锈钢,将其横截面制备成电子背散射衍射试样进行机械抛光,然后在室温下腐蚀液中进行蚀刻,去除样品表面的变形层杂质。通过SEM扫描电镜观测材料沿深度方位的梯度层,观察到加工制成的316L不锈钢形貌结构如图3所示:(a)为板材最顶部具有“网状”纳米结构的表层;(b)和(c)分别位于距离最顶部表面 $100\mu\text{m}$ 和 $200\mu\text{m}$ 的位置,均为短程有序的晶粒,其尺寸同样为纳米级。将观测图像导入ImageJ、OIM等能提取晶体组织相界的分析处理软件得到晶体结构轮廓图,统计得到 $0\mu\text{m}$ 深度处的极细纳米表层的平均晶粒尺寸为 $326\text{nm}$ 。

[0054] S4、对表面形成纳米结构层的金属材料进行磨制,分离得到纳米结构层,即为纳米

金属细胞培养界面。

[0055] 根据步骤S3的观测与统计结果可以得出处于图3中(a)层位置中的这种最细“网状”结构使材料非常坚固,因为“网状”纳米级晶界具有适合细胞体外繁殖的必要条件,为细胞的体外繁殖提供了良好的温床,故将图3中(a)层最细的“网状”纳米结构表面取下并用作细胞培养的基质界面。

[0056] 由于本发明中制取得到的纳米基质是用于生物培养,对纳米晶网状层的精细程度和表面完整性质量要求较高,为避免电火花线切割产生的局部高温对其造成腐蚀及晶粒受热长大等不可逆性损伤,本发明实施例使用带有摩擦系数检测功能的自动磨制机,自下而上对S3中去除了杂质层的板材进行磨制。

[0057] 结合图4,具体磨制过程包括以下步骤:将S3中处理后得到的板材通过弹簧夹41固定在磨制机上,同时调节高度与砂盘恰好接触;将质量为2000N的砝码42通过孔隙穿越并安装压盘,从而给试样施加数值一定的正压力;将压力传感器的线束43连接计算机显示器46;通过机械调零标尺44调节初始状态下的正压力为零;最后通过控制器按键45预设研磨终了时间为30min以及温度为常温25℃,设备运行时间及实时温度显示在显示屏中分别对应TI,LI;准备工作结束运行设备。

[0058] 以下方程描述了磨制过程不锈钢中的传热。由于将搅拌对磨头固定在磨盘坐标中,因此方程包括除传导项之外的对流项。

$$[0059] \quad \rho C_p u \cdot \nabla T + \nabla \cdot (-k \nabla T) = Q$$

[0060] 式中,k表示导热系数, $\rho$ 是密度, $C_p$ 表示比热容,u是摩擦头相对工件的速度。

[0061] 将搅拌头的销与工件之间界面上产生的热量模拟为表面热源,样品的摩擦温升读出后可通过与比热容的关系换算为表面热源发热量 $q_s(T)$

$$[0062] \quad q_s(T) = \frac{\mu}{\sqrt{3(1+\mu^2)}} r_p \omega \bar{Y}(T)$$

[0063] 式中, $\mu$ 是摩擦系数, $r_p$ 表示对磨球销的半径, $\omega$ 为对磨球销的角速度(rad/s), $\bar{Y}(T)$ 是材料的平均剪切应力,传感器中平均剪切应力是关于温度的函数。

[0064] 通过上传热公式和表面发热量的计算以评估磨损发热量对样品的影响情况,从而证明了磨制过程的温升对最后得到的基质影响不大,精细程度高。

[0065] 具体的,本实施例在磨制过程中,自动磨样机的磨损轨迹中心保持 $u=1.59 \times 10^{-3}$  m/s的恒定速度。磨制时间的确定方法为:由金属材料的原始厚度D减去磨损厚度 $D_L$ 得到剩余厚度 $D_R$ ,当剩余厚度 $D_R=D-D_L < 100 \mu\text{m}$ 时停止研磨;或当摩擦系数稳定提升至 $0.35 < \mu < 0.4$ 范围时停止研磨。本实施例中板材的尺寸为 $50 \times 50 \text{mm}^2$ ,原始厚度D为3mm,结合磨损体积 $V_w$ 与磨损表面积 $S_e$ 得到磨损厚度 $D_L$ ,其中金属材料的磨损体积和磨损表面积分别由如下公式计算得到:

$$[0066] \quad V_w = 2\pi R \left[ r^2 \sin^{-1} \left( \frac{c}{2r} \right) - \left( \frac{c}{4} \right) (4r^2 - c^2)^{0.5} \right]$$

$$[0067] \quad S_e = c \times c'$$

[0068] 式中, $V_w$ 是磨损体积( $\text{mm}^3$ ); $S_e$ 是磨损表面积( $\text{mm}^2$ );R和r分别是磨损轨迹和对磨球销的半径;c、c'分别是磨损轨迹的宽度和长度。

[0069] 在部分滑动滚压状态下,最大赫兹压力为1GPa的圆接触和线接触的法向和剪切表面牵引以及赫兹半接触 $a=100\mu\text{m}$ 施加到工件的顶面,微动位移振幅 $\delta=0.7\mu\text{m}$ 。根据Hills和Herte弹性理论关于类似材料的部分滑动微动磨损中切向力的循环变化, $c$ 和 $c'$ 可计算如下:

$$[0070] \quad c = a^3 \sqrt{1 - \frac{T_{\max}}{F_{\max}}} \quad c' = a^3 \sqrt{1 - \frac{T_{\max}}{2\mu F_{\max}} (1 - \sin(2\pi t_{\text{step}}))}$$

[0071] 式中, $F_{\max}$ 是最大法向力, $T_{\max}$ 是最大切向力(部分滑移状态下 $T_{\max} < \mu F_{\max}$ ), $F_{\max}$ 和 $T_{\max}$ 可通过滚压头传感器测量装置读出, $0 < t_{\text{step}} < 1\text{s}$ ,本实施例的 $t_{\text{step}}$ 为200ms。

[0072] 当 $D_R = 3000 - D_L < 100\mu\text{m}$ 时停止研磨机,即通过显示器观察摩擦系数稳定提升至 $0.35 < \mu < 0.4$ 范围时按下中止键,(通过将传感器检测的实时压力与时间参数导出的TXT文档拷贝至EXCEL除以砝码质量,最后通过ORIGIN图像软件绘制得到,如图5所示)在1400s时停止研磨;最后取下用镊子轻夹试样并置于培养皿中(记为NG-316L),用作培养细胞的基质界面。

[0073] 实施例2

[0074] S1、利用实施例1制备的纳米金属材料NG-316L作为细胞培养的基质界面进行细胞培养实验;另取一块初始材料,作为对照组培养的基质(记为AR-316L)。

[0075] S2、将细胞植入基质界面进行体外培养并进行形态学统计和分析

[0076] S2.1利用水、无机盐、 $\text{CO}_2$ 等配制细胞必要的体外营养环境。图6表示了细胞处于本发明制备的NG-316L金属基的超细纳米表面层培养时的体外理化环境及在纳米金属基表面的细胞引导过程。其中(I)亲水基,(II)金属中的再结晶组织,(III)加工后产生的多孔表面缺陷,(IV)加工后形成的局部粗糙表面,(V)金属离子蛋白。

[0077] S2.2将一定密度的人骨细胞分别接种在AR-316L表面和NG-316L表面基质上,分别用于检测其各自的附着扩散与繁殖的生物学功能指标。

[0078] 将密度为400000个细胞/平方厘米的细胞分别在以AR-316L和NG-316L为培养基的环境中培养2、4和6小时。培养的细胞用乙醇溶液固定30分钟,并用分级气溶胶洒脱。最终样品在还原型三磷酸腺苷中于室温下培养1小时,并使用格林尼治溅射机进行处理。然后使用扫描电子显微镜检查样品。增殖的样品在荧光显微镜中观察。

[0079] S2.3观测并统计两种培养基下细胞扩散及附着的差异。

[0080] 对在两种对照基质表面上培养了6小时后的细胞样本进行观测。结果显示细胞在两种基质表面上随着培养时间的增加而逐渐扩散。与AR-316L相比,NG-316L组在每个时间段都有更大的细胞密度,表明在NG-316L表面有更好的附着。观测得到细胞在NG-316L表面的扩散比在AR-316L表面的扩散更广泛。进一步地,使用ImageJ软件分析细胞密度和细胞覆盖面积观测图,以确定细胞附着和扩散的有效性,细胞覆盖率和细胞密度的统计分析结果分别如图7(a)、(b)所示。综合观测结果与图像统计软件的数据可以得出,与未处理的AR-316L表面相比,本发明制备得到的NG-316L表面上培养的细胞表现出更好的附着和更广泛的扩散。

[0081] S2.4观测并统计两种培养基下细胞繁殖能力的差异

[0082] 将密度为400000个细胞/平方厘米的细胞分别在以AR-316L和NG-316L为培养基的

环境中增殖培养12小时后收集样本,以确保细胞经历高水平的增殖后在荧光显微镜下观测,两种基质的样本结果分别如图8(a)(b),图中利用R-H染色用于指示细胞周期状态。从图8(a)和(b)可以看出R-H阳性细胞进行细胞增殖,而阴性细胞处于静默状态,分别记录图8(a)和(b)中两种基质下培养的细胞样本中R-H阳性细胞的数目分别为 $N_{r1}$ 、 $N_{r2}$ ,R-H阴性细胞的数目分别为 $N_{b1}$ 、 $N_{b2}$ ,根据下式计算两组培养样本的细胞比率:

$$[0083] \quad DAPI_A = \frac{N_{r1}}{N_{r1} + N_{b1}}$$

$$[0084] \quad DAPI_B = \frac{N_{r2}}{N_{r2} + N_{b2}}$$

[0085] 式中的 $N_{r1}$ 、 $N_{r2}$ 为分别在AR-316L基质和NG-316L两种界面培养12h后增殖细胞数目; $N_{b1}$ 、 $N_{b2}$ 为分别在两种界面培养12h后静止未增殖细胞数目; $DAPI_A$ 为在AR-316L基质中培养的人成骨细胞样本中增殖细胞的百分比率; $DAPI_B$ 为在NG-316L基质中培养的人成骨细胞样本中增殖细胞的百分比率。

[0086] 该指标用于评估细胞增殖率的大小,用于确定细胞体外增殖的速率,两种样本的细胞增殖观测与统计分析计算结果,如图8(c)和(d)所示,可以看出在NG-316L表面基质培养的样本中增殖细胞数目和细胞增殖指数( $DAPI_B$ 为87%),这两个指标均高于在相同环境下增殖培养相同时间后的AR-316L培养基质样本( $DAPI_A$ 为69%)。

[0087] 通过对比细胞在两种结构的基质表面的体外培养的观测与统计结果,并利用细胞密度和细胞覆盖率分别评价附着、扩散的形态学性能,利用增殖指数DAPI评估细胞繁殖能力,表明将本发明制备和设计的表面“网状”纳米结构基质NG-316L作为细胞培养界面能够显著改善细胞体外繁殖的效率,增强细胞的综合生物功能。

[0088] 综上所述,本发明与传统生物培养界面的“表面形貌修饰”方法不同的是,基于316L不锈钢板材,提出了一种制备体外细胞培养的网状纳米结构界面制备的方法,首先利用高密度和频率的超声能量场和脉冲电流对基质板材进行低塑性微动对磨抛光进行均质化纳米化表面改性,其次在自动研磨机通过磨损的方式对其残余厚度进行调控,处理得到的纳米晶网状层的精细程度和表面完整性质量较高,无损表面提取技术避免电火花线切割产生的局部高温对其造成腐蚀及晶粒受热长大等不可逆性损伤,同时通过体外培养的对照实验和检测及统计验证了该基质的高效性及可靠性。

[0089] 本发明提出的一种稳定的纳米金属细胞培养界面的制备方法,立足于将材料纳米化的先进加工制造与生物工程的技术融合,技术方案有别于目前已有的用于成骨细胞培养的基质形态及生产手段,从加工手段本身,降低了生产本基质的时间和加工成本,避免了高温电化学腐蚀的不利影响,耦合超频滚压与大电流处理及无损表面提取技术,同时所设计的方法能实现定量计算加工出的基质有效培养面积以及厚度,从而为获得稳定高效、均质、工作可靠的细胞基质内部结构提供可能。

[0090] 需要说明的是,以上各实施例均属于同一发明构思,各实施例的描述各有侧重,在个别实施例中描述未详尽之处,可参考其他实施例中的描述。

[0091] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

---

因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

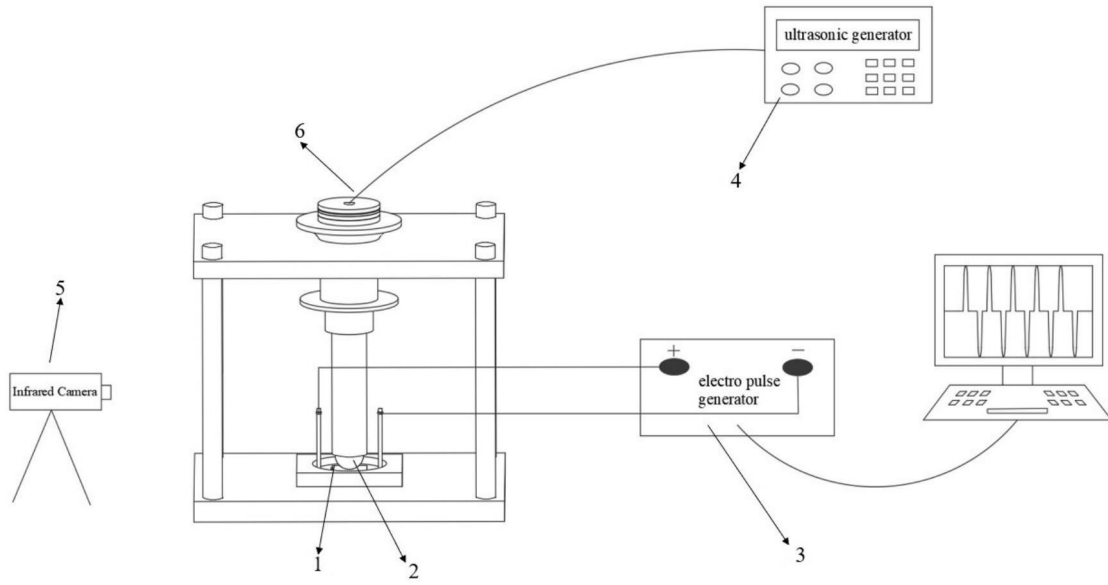


图1

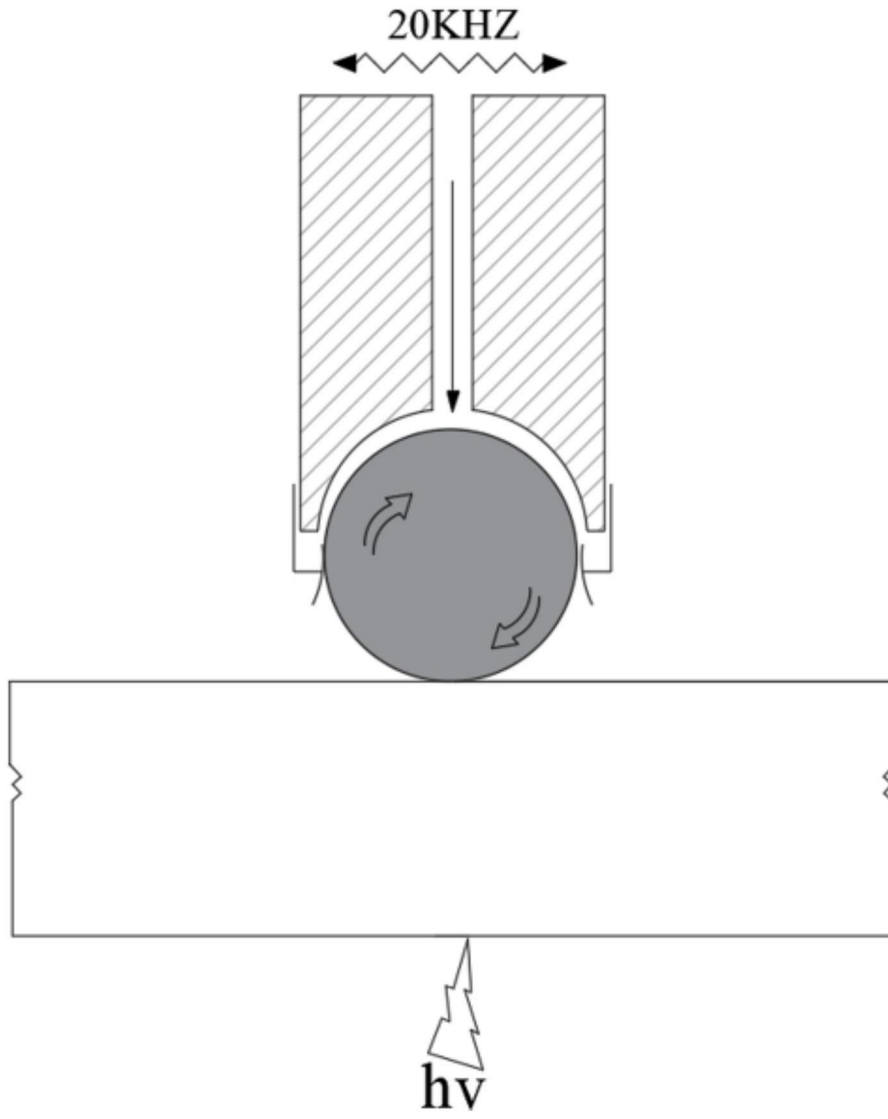


图2

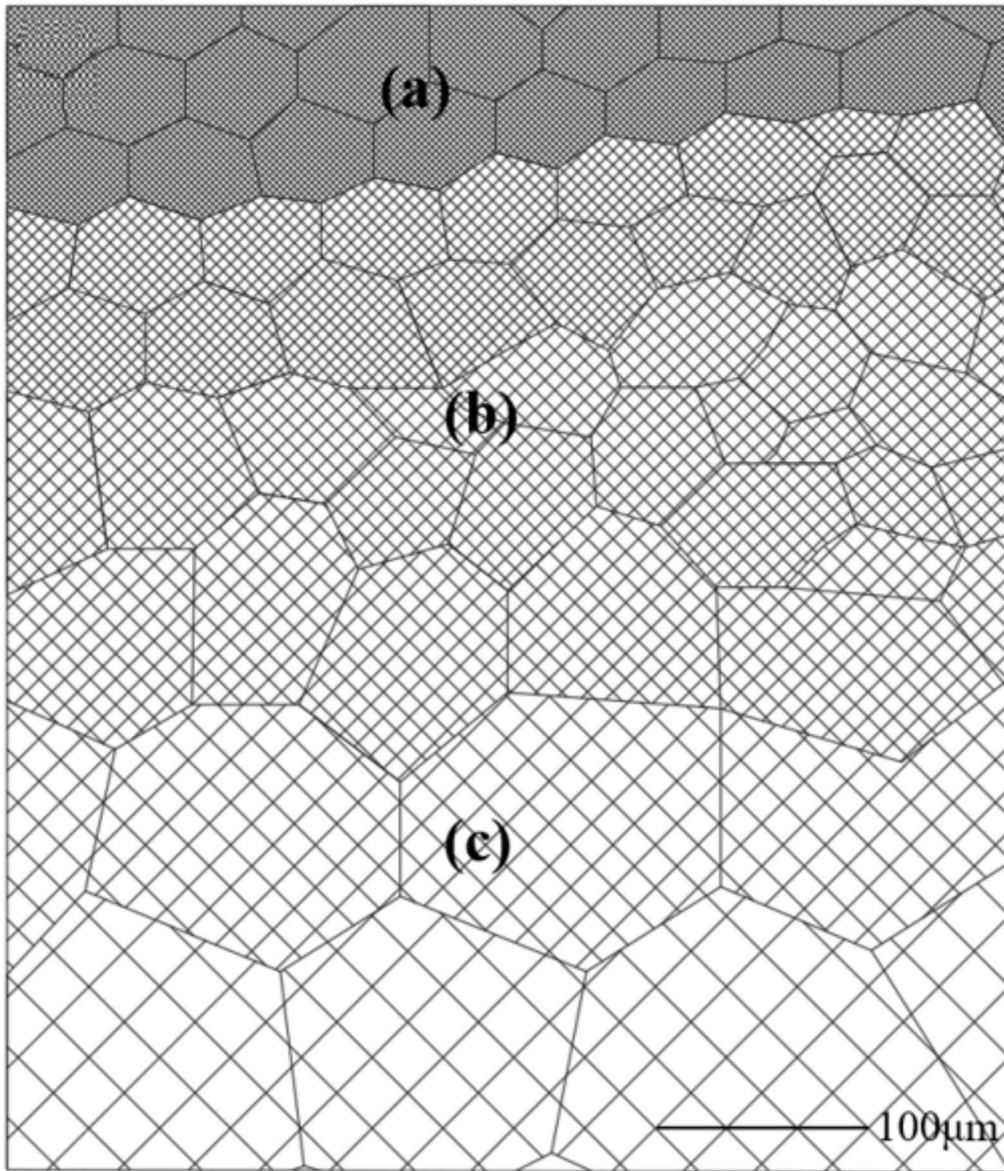


图3

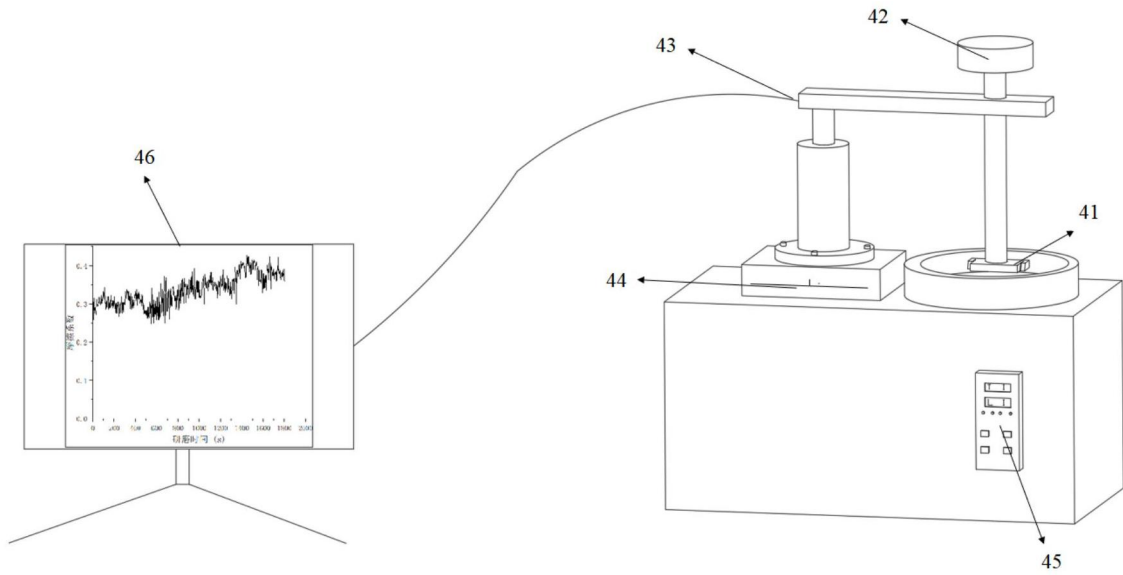


图4

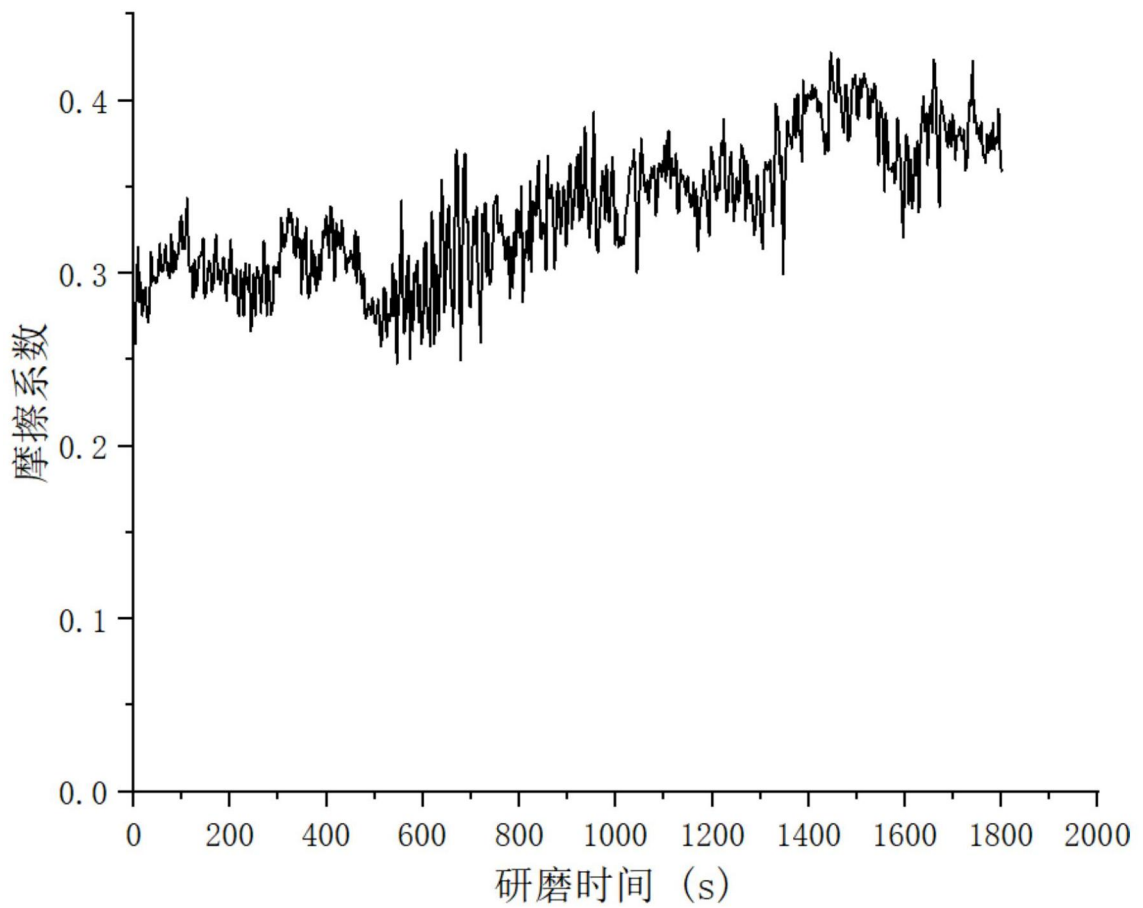


图5

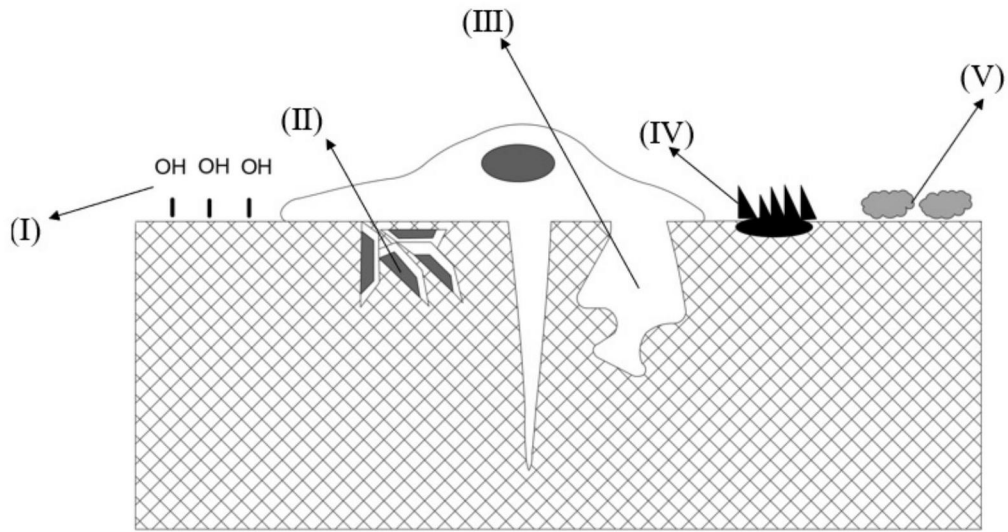


图6

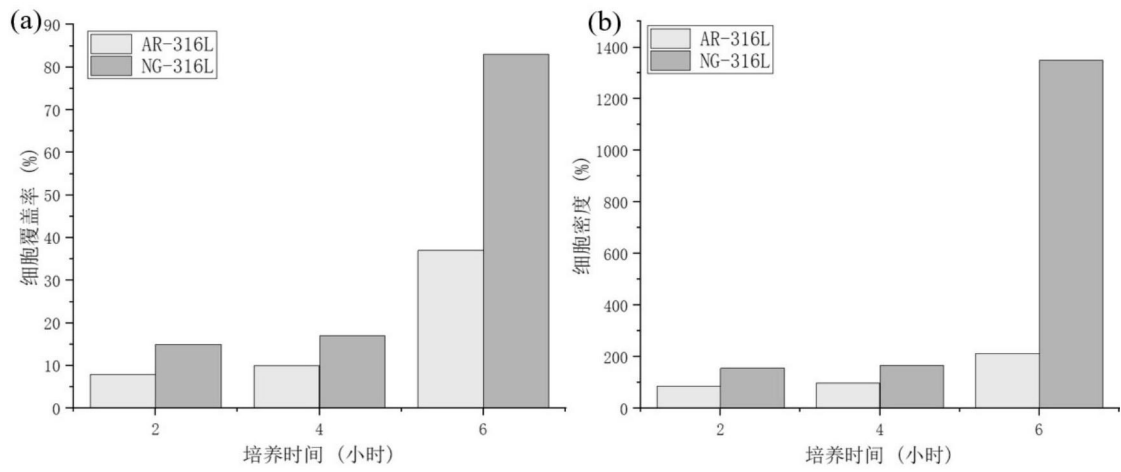


图7

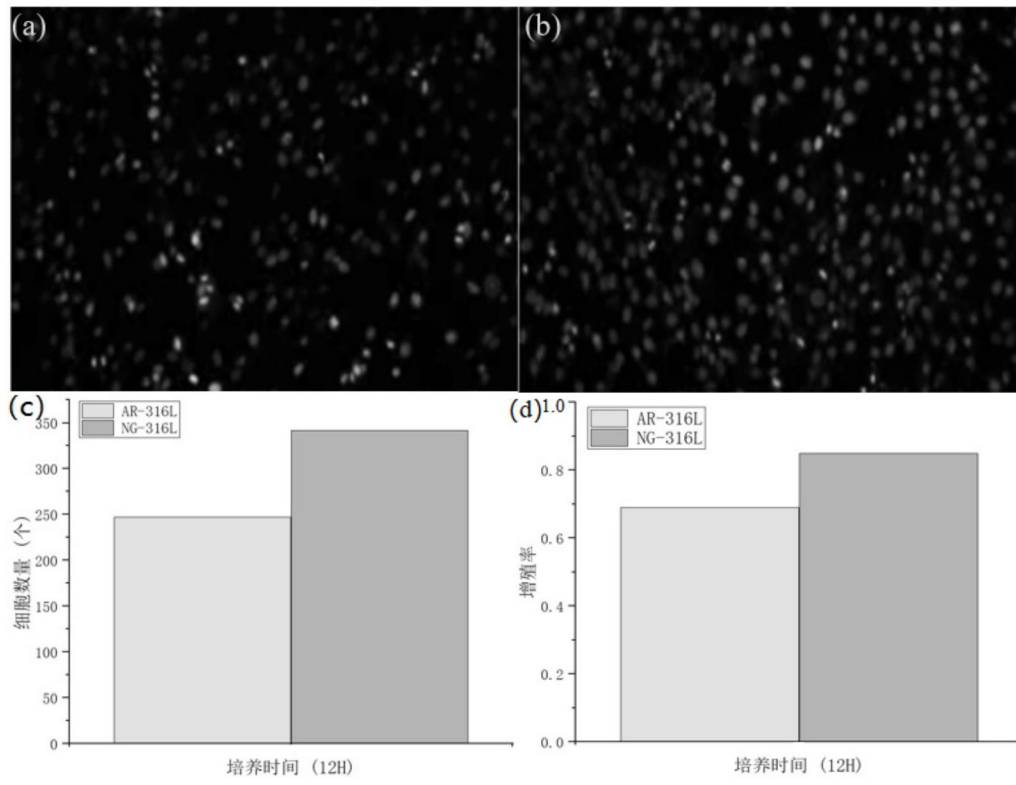


图8