

doi: 10.11933/j.issn.1007-9289.20190419003

# 钛种植体表面 CuO 和 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 共掺杂 TiO<sub>2</sub> 涂层的 制备及抗菌性能和生物相容性

杨明刚<sup>1</sup>, 吕晨<sup>2</sup>, 刘慧<sup>1</sup>, 赵晓兵<sup>2</sup>, 王国成<sup>1</sup>

(1. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055; 2. 常州大学材料科学与工程学院, 常州 213164)

**摘要:** 利用等离子体喷涂技术在医用钛合金表面成功制备 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层, 并对涂层的微观结构、表面粗糙度、表面亲疏水性、化学稳定性进行表征。利用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌来评价涂层的抗菌性能, 利用小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14 细胞来评价涂层的细胞相容性。结果表明: 等离子体喷涂 TiO<sub>2</sub> 涂层主要由金红石和少量锐钛矿相组成, 而在 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层中均出现了 Ti<sub>0.95</sub>Nb<sub>0.95</sub>O<sub>4</sub> 固溶体和特殊的棒状交织结构; Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 的掺杂增加了 TiO<sub>2</sub> 涂层的表面粗糙度, 改善其亲水性。Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 掺杂提高了细胞的增殖能力和成骨分化能力, CuO 和 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 共掺杂显著提高了 TiO<sub>2</sub> 涂层的抗菌性能, 但 Cu 离子的释放降低了 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的细胞相容性。和 TiO<sub>2</sub> 涂层相比, 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的细胞相容性并未明显降低, 说明 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 掺入可一定程度上抑制了 Cu 离子对细胞的副作用。

**关键词:** 钛种植体; 抗菌活性; 等离子体喷涂; 细胞相容性; 表面改性

中图分类号: TG174.44; R783.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-9289(2019)05-0022-08

## Preparation of CuO and Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Co-doped TiO<sub>2</sub> Coating on Titanium Implants and Its Antibacterial Properties and Biocompatibility

YANG Minggang<sup>1</sup>, LV Chen<sup>2</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, ZHAO Xiaobing<sup>2</sup>, WANG Guocheng<sup>1</sup>

(1. Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China; 2. School of Materials Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** TiO<sub>2</sub>, 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> coatings were prepared on the medical titanium alloy surface by plasma spraying technique. The microstructure, surface roughness, surface wettability and chemical stability of the coating were investigated. The antibacterial properties of the coating were evaluated using *S. aureus* and *E. coli*, and the cellular compatibility of the coating was evaluated by mouse preosteoblasts. The results show that the plasma sprayed TiO<sub>2</sub> coating mainly consists of rutile and a small amount of anatase phase. Ti<sub>0.95</sub>Nb<sub>0.95</sub>O<sub>4</sub> solid solution and special rod-like interweaving structure appears in the 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> coatings. The doping of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and CuO increases the surface roughness, and improves the hydrophilicity of the TiO<sub>2</sub> coating. The results of cell experiments and antibacterial experiments reveal that the doping of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> improves the cell proliferation and osteogenic activity of osteoblasts. Co-doping Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and CuO significantly improves the antibacterial properties of TiO<sub>2</sub> coating, while the release of Cu ions reduces the cell compatibility of the 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> coating. However, compared with TiO<sub>2</sub> coating, the cell compatibility of the 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> coating was not significantly reduced, indicating that doped of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> can inhibit the negative effects of Cu ions on cells to some extent.

**Keywords:** titanium implant; antibacterial activity; plasma spraying; cytocompatibility; surface modification

收稿日期: 2019-04-19; 修回日期: 2019-07-15

通信作者: 王国成 (1982—), 男 (汉), 副研究员, 博士; 研究方向: 生物材料及表面改性; E-mail: gc.wang@siat.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (51872318); 广东省自然科学基金 (2018A030313015); 深圳国际合作项目 (GJHZ20180420180912286)

**Fund:** Supported by National Natural Science Foundation of China (51872318), Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030313015) and Shenzhen Science and Technology Research Funding (GJHZ20180420180912286)

引用格式: 杨明刚, 吕晨, 刘慧, 等. 钛种植体表面 CuO 和 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 共掺杂 TiO<sub>2</sub> 涂层的制备及抗菌性能和生物相容性[J]. 中国表面工程, 2019, 32(5): 22-29.

YANG M G, LV C, LIU H, et al. Preparation of CuO and Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Co-doped TiO<sub>2</sub> coating on titanium implants and its antibacterial properties and biocompatibility[J]. China Surface Engineering, 2019, 32(5): 22-29.

## 0 引言

钛及钛合金由于其良好的力学性能、抗腐蚀性能和优良的生物相容性<sup>[1-2]</sup>, 被广泛用做骨科植入体<sup>[3-5]</sup>。钛种植体的主要问题是生物活性差和不具有抗菌性能, 二者是目前植入体失败的两大重要原因。因此, 提高种植体的生物活性和抗菌性能是提高种植体长期稳定的关键。TiO<sub>2</sub> 具有良好的化学稳定性、生物相容性以及和钛合金基体结合强等优点, 被广泛用于钛合金种植体的表面改性<sup>[6]</sup>, 但 TiO<sub>2</sub> 涂层的生物活性有待进一步提高。在前期工作中, 作者基于等离子体喷涂技术特殊的热历史条件, 通过在 TiO<sub>2</sub> 涂层中掺入 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 制备了具有微纳米结构的 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 复合涂层, 实现了对涂层表面微纳米结构的调控。细胞实验结果表明, 与 TiO<sub>2</sub> 涂层相比, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 复合涂层具有更佳生物活性<sup>[7]</sup>。但该涂层仍不具有抗菌性能, 限制其在种植体表面改性方面的潜在应用。

目前的研究表明通过在表面涂层中添加抗菌元素(银、镓等)<sup>[8-9]</sup>, 抗菌多肽<sup>[10-12]</sup>或抗生素<sup>[13-15]</sup>等可赋予种植体抗菌性能。因可操作性高、成本低以及抗菌效果显著等优点, 抗菌元素掺杂在植入体表面改性方面得到了广泛使用。铜离子是人体所必需的微量元素, 参与大部分组织器官的新陈代谢过程<sup>[16]</sup>。它能够促进血管化<sup>[17]</sup>, 提高骨愈合速率<sup>[18]</sup>。相关研究表明, 与锌离子和银离子相比, 铜离子具有良好的抗菌性能和较好的细胞兼容性<sup>[19]</sup>。Zhang Lan 等<sup>[20]</sup>用阳极氧化的方法在钛合金表面制备了铜掺杂涂层, 并验证了涂层的抗菌性能和生物相容性。研究结果表明铜离子掺杂显著提高了涂层对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制, 同时能够促进小鼠成纤维细胞的增殖。因此, 鉴于铜离子的优点, 为赋予 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层抗菌性能, 将一定比例的 CuO 掺杂在 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层中, 考察掺杂 CuO 后对 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层物化性能的影响, 利用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌评价涂层的抗菌性能, 利用小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14(MC3T3-E1 Subclone 14)评价涂层的生物相容性。

## 1 材料与方法

### 1.1 涂层的制备

#### 1.1.1 热喷涂原料

喷涂原料选用 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 粉(上海杏田新材料科技

有限公司, 纯度>99.9%)、CuO 粉(Aladdin, 分析纯)和 TiO<sub>2</sub> 粉(P25, Degussa, 德国)。按质量比为 50:50 称取 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 TiO<sub>2</sub> 粉, 按质量比为 1:49:50 称取 CuO、Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 TiO<sub>2</sub> 粉, 球磨 4 h, 使粉料充分混合。将混合充分的浆料置于鼓风干燥箱中干燥 12 h, 研磨烘干的粉料过 80 目筛, 再向过筛后的粉末中添加适量浓度为 5% 的 PVA 溶液进行造粒烘干, 最后研磨粉料依次过筛, 去除细粉, 取 70~180 μm(80~200 目)的粉末作为喷涂原料。采用相同方法制备 TiO<sub>2</sub> 喷涂粉。

#### 1.1.2 涂层的制备

采用尺寸为 Φ10 mm×1 mm 的钛合金(Ti-6Al-4V)作为涂层基体, 喷涂前使用 46 号棕刚玉对基体进行喷砂处理。选用美国 Sulzer Metco 公司生产的 9M 型大气等离子喷涂设备制备涂层。喷涂工艺参数: 氩气流量 40 L/min, 氢气流量 12 L/min, 喷涂功率 42 kW, 喷涂距离 100 mm, 送粉率 20 g/min。

## 1.2 涂层的表征

### 1.2.1 涂层的微观形貌和结构表征

采用 X 射线衍射仪(XRD, Rigaku, D/max 2500PC, 日本)对涂层的物相组成进行表征。具体参数: Cu 靶 Kα 辐射, 特征波长 λ=0.154 056 nm, 衍射角 (2θ) 的扫描速度为 0.02 (°)/s, 扫描范围为 20°~80°, 电流 100 mA, 电压 40 kV。采用场发射扫描电子显微镜(FE-SEM, Zeiss, SUPRA55, 德国)对涂层表面形貌进行观察。

### 1.2.2 涂层的表面粗糙度和表面润湿性表征

采用手持式粗糙度仪(北京时代之峰科技有限公司, TR200)对涂层表面粗糙度进行测试。每个涂层样品表面随机选取 10 个点测量, 取平均值。采用接触角测量仪(上海中晨数字技术设备有限公司, JC2000DI)测试涂层的水接触角, 考察涂层的亲疏水性。每种涂层表面选取 5 个点测量, 取平均值。

### 1.2.3 离子释放

将涂层分别用无水乙醇和去离子水超声清洗后烘干, 浸泡于 20 mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 置于培养箱(36.5 °C)中培养 3、7 和 14 d。采用电感耦合等离子体发射光谱仪(Vista-Ax, Varian Company, America)测试浸泡液中含有涂层元素的离子浓度。

### 1.3 涂层的抗菌性能评价

#### 1.3.1 细菌的培养

利用革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和革兰氏阴性菌大肠杆菌 (*E. coli*) 对所制备的涂层的抗菌性能进行评价。首先, 将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在琼脂培养板上, 37 °C 培养箱中培养 24 h 后, 用 PBS 稀释成  $10^8$  CFU/mL 的密度, 然后用大豆肉汤培养基配制密度 107 CFU/mL 的菌液备用。其次, 将高温高压灭菌后样品置于 24 孔板中, 每孔加入 1 mL 的细菌悬液, 37 °C 下培养 24 h。

#### 1.3.2 细菌活性的评价

将培养 24 h 后的样本用 PBS 清洗 3 次, 然后每孔加入 1 mL 的 MTT 染色液 (含 0.5 mg/mL MTT 的 PBS 溶液), 将培养板放入培养箱中 37 °C 培养 1 h, 然后将样品转移至新的 24 孔板中, 每孔加入 1 mL 的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 室温避光环境下用摇床以 80 r/min 的速度摇晃 20 min, 将 200  $\mu$ L 溶解有着色物质的 DMSO 溶液转移至 96 孔板, 用酶标仪测量波长在 570 nm 波长处的吸光度值。

#### 1.3.3 菌落单位形成能力评价

将培养 24 h 后的生物样本用 PBS 清洗 3 次后, 将细菌从材料表面震荡下来, 用 PBS 将细菌稀释  $10^4$  倍, 然后取 100  $\mu$ L 在琼脂板上涂匀, 置于 37 °C 的培养箱中培养 24 h 后, 用菌落分析仪拍照和统计细菌的数量。

#### 1.3.4 细菌形貌观察

将培养 24 h 后的样本用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 1 mL 2.5% 的戊二醛 4 °C 固定过夜, 去除戊二醛溶液, 用 PBS 清洗 3 次后, 依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100% (体积分数) 的乙醇逐级脱水 10 min, 干燥、喷铂后, 用扫描电镜观察细菌形貌。

### 1.4 涂层的生物相容性评价

#### 1.4.1 细胞的增殖

将材料高温高压灭菌后置于 24 孔板中, 用 PBS 清洗 3 次, 将 MC3T3-E1 细胞以  $5 \times 10^4$  cells/孔的密度接种于材料上, 在培养箱中分别培养 1、3、5 和 7 d。在每个时间点, 移除原培养液, 每孔中加入 500  $\mu$ L 的 DMEM 培养基 (DMEM : CCK-8=9 : 1) 后在培养箱中孵育 2 h 后, 将收集液转移

到 96 孔板中, 每孔加入量为 200  $\mu$ L, 用酶标仪测量在波长 450 nm 处的吸光度值, 所有的试验重复 3 次。

#### 1.4.2 碱性磷酸酶活性定量检测

将材料高温高压灭菌后置于 24 孔板中, 用 PBS 清洗 3 次, 将 MC3T3-E1 细胞以  $5 \times 10^4$  cells/孔的密度接种材料上, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下分别培养 3 和 7 d 后, 按照碱性磷酸酶试剂盒的操作步骤来测量不同材料上碱性磷酸酶的含量。

#### 1.4.3 与成骨相关基因的定量检测

将材料高温高压灭菌后置于 24 孔板中, 用 PBS 清洗 3 次, 将 MC3T3-E1 细胞以  $1 \times 10^5$  cells/孔的密度接种材料上, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 14 d 后, 按照实时荧光定量 PCR 操作步骤来检测不同材料上与成骨相关基因 Runx-2, OCN, OPN 和 ALP 的表达。

## 2 结果与讨论

### 2.1 涂层的形貌和物相分析

TiO<sub>2</sub>、50%Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1%CuO-49%Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的表面形貌如图 1 所示。所有的

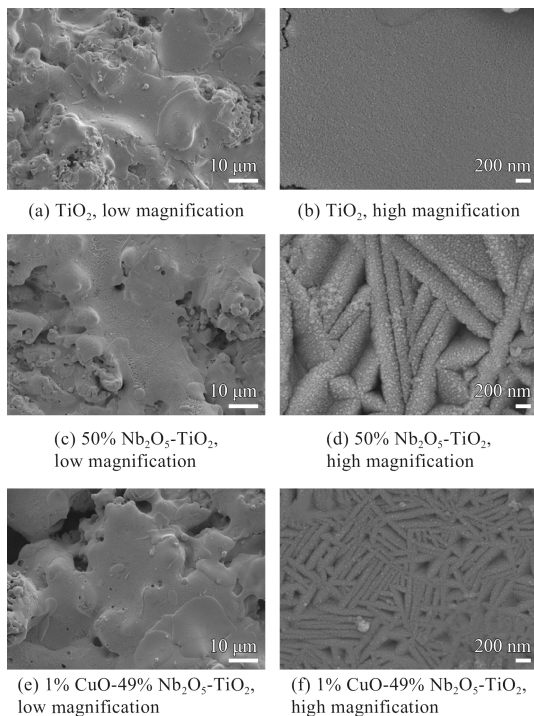


图 1 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1%CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的表面形貌

Fig.1 Surface morphologies of TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> coating

涂层均具有典型的等离子体喷涂涂层的表面形貌, 由熔融、半熔融与少量未熔融颗粒组成, 有些裂纹和气孔。从 TiO<sub>2</sub> 涂层的高倍图中可以看出, 涂层表面由许多纳米颗粒构成, 这些纳米颗粒的形成可能是由于熔融颗粒在等离子喷涂的快速固化过程中发生了重结晶。因等离子体喷涂具有超高温和超快速冷却两大特点, 熔融颗粒在快速固化过程中, 晶粒的生长会受到较程度上的抑制, 从而导致了涂层表面纳米晶粒的形成<sup>[21]</sup>。由于 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的掺入, 在 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层表面形成了独有的棒状的特殊形貌。其中, 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层表面的棒状形貌尺寸小于 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的, 这可能是因为 CuO 的掺杂抑制了棒状晶粒的生长<sup>[22]</sup>。

TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 粉末和涂层的 XRD 图谱分析如图 2 所示。从图 2 看出, TiO<sub>2</sub> 粉末主要是由锐钛矿相 (TiO<sub>2</sub>, A) 和少量的金红石相 (TiO<sub>2</sub>, R) 构成<sup>[23-24]</sup>。等离子体喷涂后, 锐钛矿相向金红石相转变。在

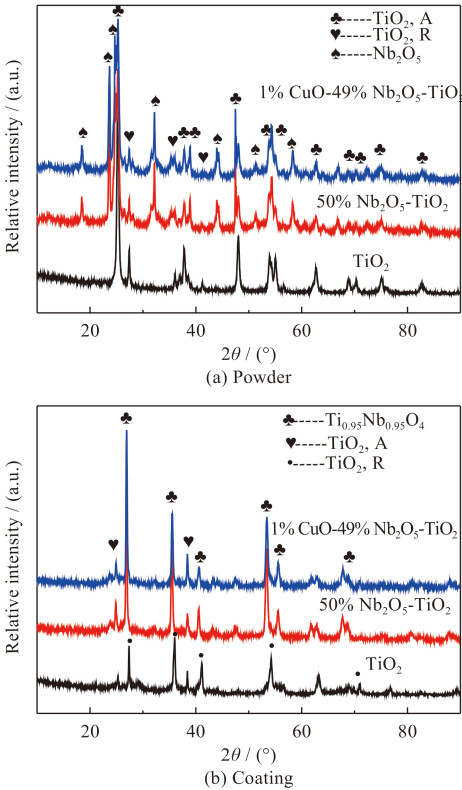


图 2 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 粉末和涂层的 XRD 图谱  
Fig.2 XRD patterns of TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> powders and coatings

50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层中形成了 Ti<sub>0.95</sub>Nb<sub>0.95</sub>O<sub>4</sub> 固溶体, 表明在喷涂过程中, Nb<sup>5+</sup>进入 TiO<sub>2</sub> 晶格中, 形成了稳定的固溶体结构。

2.2 涂层的表面粗糙度和表面润湿性

TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的表面粗糙度如图 3(a) 所示。从图中可以看出, 涂层均具有微米级的表面粗糙度。TiO<sub>2</sub> 涂层的表面粗糙度约为 8 μm, 掺入 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 后, 涂层的表面粗糙度逐渐升高。这可能是因为涂层表面形成了 Ti<sub>0.95</sub>Nb<sub>0.95</sub>O<sub>4</sub> 固溶体增加了涂层的表面粗糙度。

TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层表面的接触角如图 3(b) 所示。TiO<sub>2</sub> 涂层的接触角大于 90°, 表现出疏水的性能, 在掺入 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 后, 涂层表面的水接触

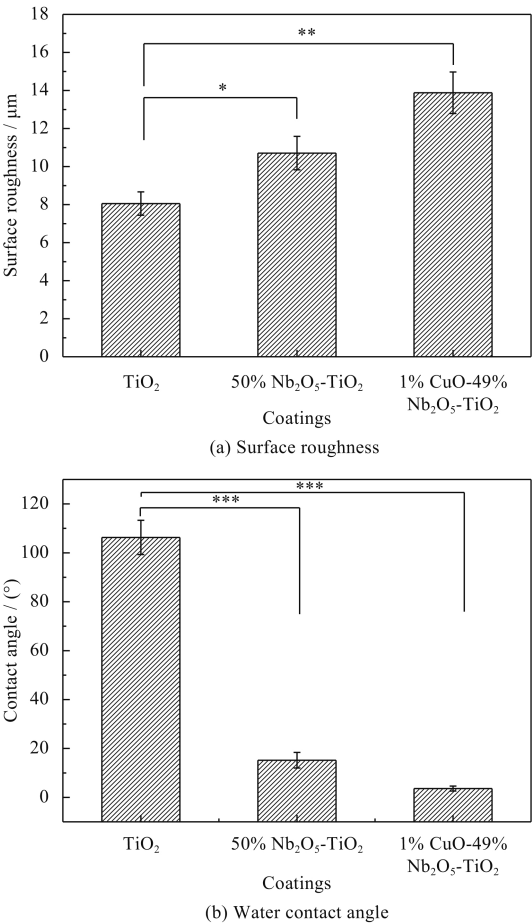
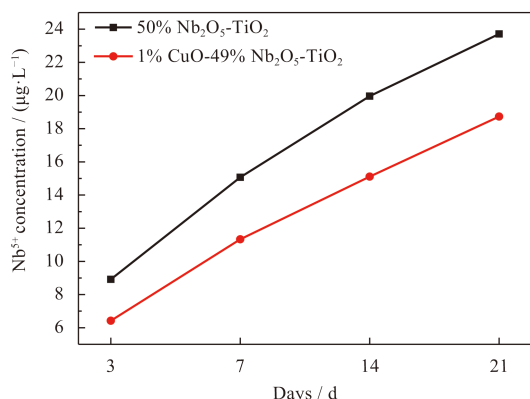


图 3 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的表面粗糙度和水接触角 (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001)  
Fig.3 Surface roughness and water contact angle of TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> coating

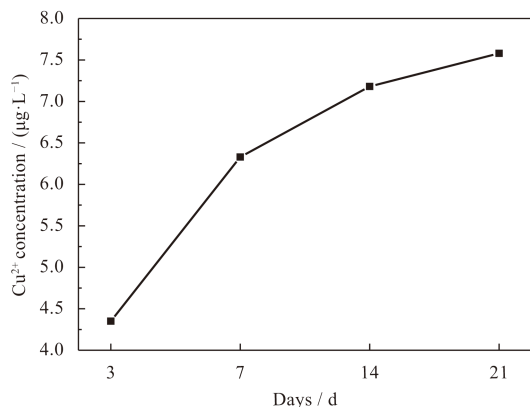
角大幅度下降, 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层的接触角最低, 约为 8°, 亲水性能最优异。掺杂 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 后涂层亲水性能的提高可能是因为 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层表面形成了棒状的形貌, 增加了涂层的表面粗糙度, 有利于涂层表面水分子的扩散, 从而提高了涂层的亲水性能<sup>[25]</sup>。因此, 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层表面水接触角最小, 表现出最好的亲水性。

### 2.3 离子释放

涂层在 Tris-HCl 缓冲溶液中的离子释放情况如图 4 所示。由于 TiO<sub>2</sub> 具有极好的化学稳定性, 经过测试在浸泡后均未发现 Ti<sup>4+</sup> 的释放。图 4(a) 是 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层中 Nb<sup>5+</sup> 的释放情况, 可以看出, 随着浸泡天数的增加, Nb<sup>5+</sup> 的释放量逐渐增多, 但增加幅度逐渐减小, 在 21 天后, 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和



(a) Nb<sup>5+</sup> concentration



(b) Cu<sup>2+</sup> concentration

图 4 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层浸泡在 Tris-HCl 溶液中的 Nb<sup>5+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 的含量

Fig.4 Content of Nb<sup>5+</sup> and Cu<sup>2+</sup> for 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> coating in Tris-HCl solution

1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层中 Nb<sup>5+</sup> 的释放量分别为 24 μg/L 和 18 μg/L 左右。图 4(b) 是 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层中 Cu<sup>2+</sup> 的释放情况, 从图中可知, 随着浸泡时间的增加, Cu<sup>2+</sup> 的释放幅度逐渐减少, 在 21 天后达到了 7.5 mg/L 左右。可以发现, 虽然涂层中 CuO 的掺杂量明显低于 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 但浸泡 21 天后 Cu<sup>2+</sup> 的释放量却达到了 Nb<sup>5+</sup> 释放量的 416 倍左右, 这可能是由于 Nb 和 Cu 在晶格中处于不同位置导致的。

### 2.4 抗菌性能的评价

大肠杆菌 (*E. coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 在 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 上的活性、菌落形成能力及细菌形貌分别见图 5、图 6 和图 7。从图 5 和图 6 可知, 掺杂 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 后, *E. coli* 和 *S. aureus* 在 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层上的生长受到一定的抑制。从图 7 可以发现, *E. coli* 和 *S. aureus* 在 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层上粘附的数量较少, 部分细菌的细胞膜的完整性遭到破坏。这表明 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层对 *E. coli* 和 *S. aureus* 具有微弱的杀伤作用, 这可能是因为掺杂氧化铌后形成的特殊微纳米结构具有一定程度抑制细菌粘附的作用<sup>[26]</sup>; 但同时掺杂 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 的涂层能够显著抑制 *E. coli* 和 *S. aureus* 的粘附 (图 5 和 6), 且大部分细菌的细胞膜遭到破坏, 使细菌丧失活性 (图 7)。综合此抗菌数据, 可以得出如下结论: Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 共同掺杂的涂层的抗菌性能最佳, 其抗菌性能主要源自 Cu 离子的释

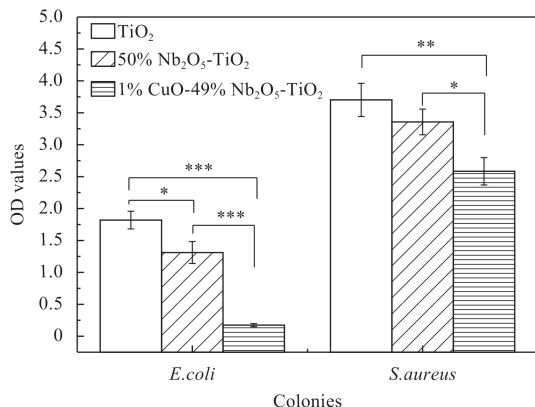


图 5 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层与 *E. coli* 和 *S. aureus* 培养 24 h 后的活性 (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001)

Fig.5 Bacterial activity of *E. coli* and *S. aureus* cultured on TiO<sub>2</sub>, 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> for 24 h

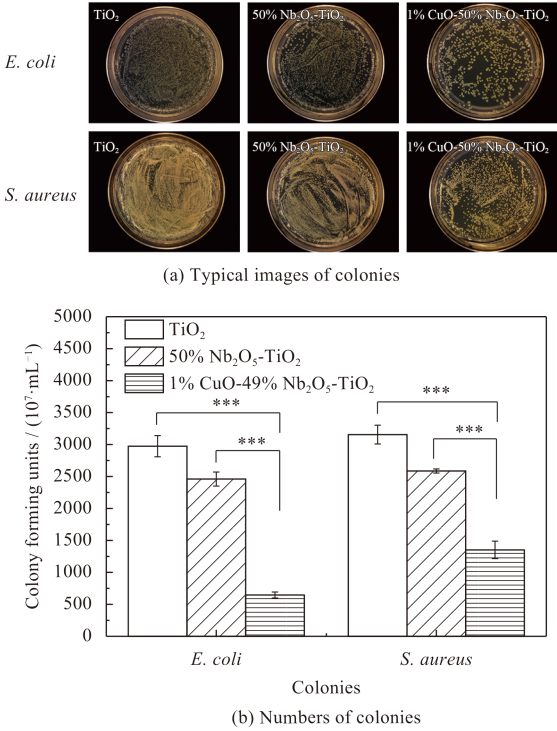


图 6 *E. coli* 和 *S. aureus* 再培养 24 h 后在 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层上形成菌落的照片和细菌数量 (\*\*\*)*p*<0.001)

Fig.6 Typical images and numbers of re-cultivated *E. coli* and *S. aureus* colonies from samples after 24 h of incubation

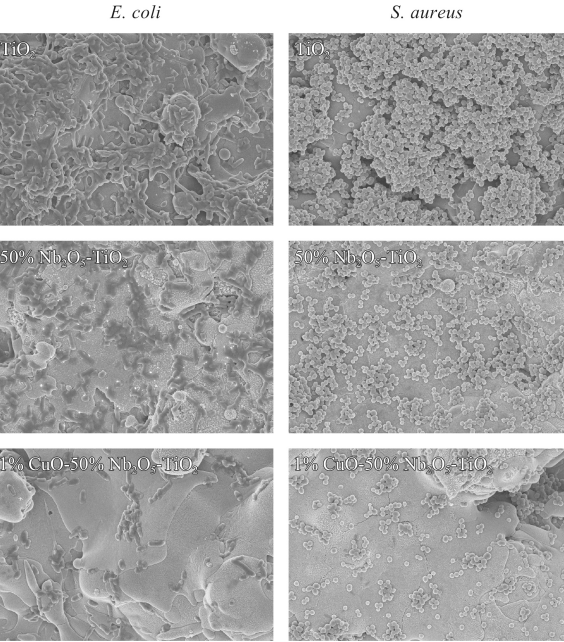


图 7 *E. coli* 和 *S. aureus* 在 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层培养 24 h 后的 SEM 形貌

Fig.7 SEM images of *E. coli* and *S. aureus* cultured on TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> after incubation for 24 h

放。Cu 离子的抗菌性能已经被广泛报道, S. Wang 等<sup>[27]</sup> 人利用磁控溅射将 Cu 离子注入到纳米结构的钽基材上, 并利用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌验证材料的抗菌性能, 研究结果表明, Cu 离子的注入能够显著提高其抗菌性能。

## 2.5 涂层的细胞相容性评价

MC3T3-E1 在 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层上的增殖、碱性磷酸酶的活力及成骨相关基因的表达分别见图 8~10。从图 8 中可知, 随着培养时间的增加, MC3T3-E1 在 3 种材料上均有增殖。在第 5 d 以后, MC3T3-E1 在 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 上的增殖优于 TiO<sub>2</sub>。从图 9、10 可知, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 掺杂不仅显著提高了细胞碱性磷酸酶的活性, 同时上调了 Runx-2、OCN、OPN 和 ALP 的表达, 此结果说明 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 掺杂促进了细胞的成骨活性。从图 3(b) 可知, 氧化铌掺杂提高了涂层的亲水性且导致特殊的微纳米结构的形成。据文献报道, 细胞在亲水表面能够更好的粘附、增殖和成骨分化<sup>[28]</sup>。微纳米结构对成骨细胞功能的促进作用也得到了广泛验证。Jiang Shuai 等的研究证明利用阳极氧化在钛合金表面形成的微纳米结构能够显著促进骨整合<sup>[29]</sup>。因此, 认为良好的亲水性和微纳米结构是 50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层具有较好生物活性的主要原因。CuO 掺杂后, 不论是碱性磷酸酶活性还是成骨基因表达较单纯的 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 掺杂都有明显减弱, 但和 TiO<sub>2</sub> 涂层相比减

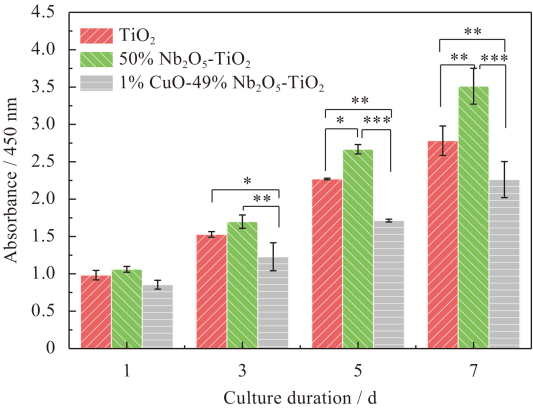


图 8 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 与 MC3T3-E1 分别培养 1、3、5 和 7 天后的增殖 (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001)

Fig.8 Cell proliferation of MC3T3-E1 cultured on TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> for 1, 3, 5 and 7d, respectively

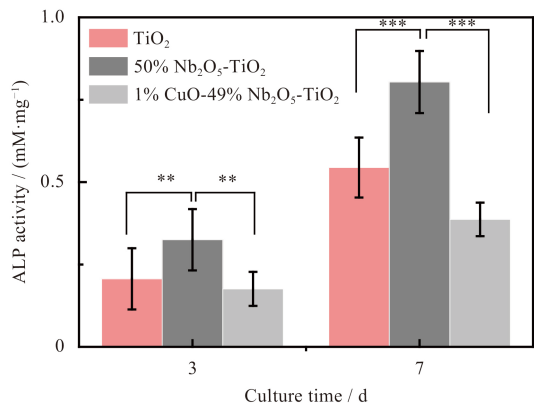


图9 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 与 MC3T3-E1 分别培养 3 d 和 7 d 后的碱性磷酸酶的活性 (\*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ )

Fig.9 ALP activity of the MC3T3-E1 cultured on TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> for 3 and 7 d

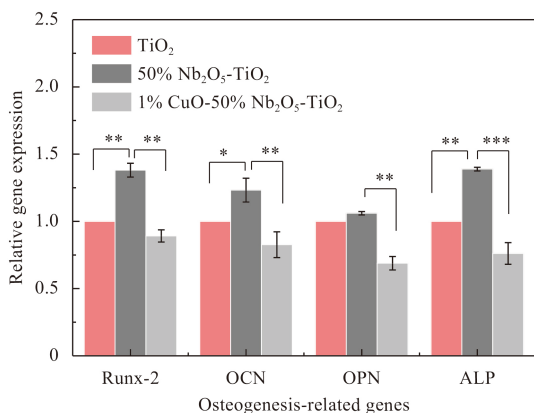


图10 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 与 MC3T3-E1 培养 14 d 后与成骨相关基因的表达 (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ )

Fig.10 Real-time PCR detection of osteogenesis-related genes expressed by the MC3T3-E1 cultured on TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> and 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> for 14 d

弱并不是十分明显,这说明 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的掺杂一定程度上缓解了 Cu 离子释放造成的副作用。

### 3 结 论

利用等离子体喷涂技术在钛合金表面制备了 TiO<sub>2</sub>、50% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 和 1% CuO-49% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 涂层,研究了 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 共掺对 TiO<sub>2</sub> 涂层生物活性和抗菌性能的影响。结果表明: Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 CuO 掺杂提高了 TiO<sub>2</sub> 涂层的表面粗糙度、亲水性。Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 掺杂可显著提高成骨细胞的增殖和成骨活性, CuO 和 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 共掺杂的涂层具有显著的抗菌性能,但 Cu 离子的释放一定程度上降低了涂层表面细胞的活性。此结果证明 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 掺杂一

定程度上可降低 Cu 离子对细胞的负面作用。

### 参考文献

- [1] GEETHA M, SINGH A K, ASOKAM A R, et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review[J]. *Progress in Materials Science*, 2009, 54(3): 397-425.
- [2] NIINOMI M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2008, 1(1): 30-42.
- [3] PULEO D A, KISSLING R A, SHEU M S. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4(BMP-4), on titanium alloy[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(9): 2079-2087.
- [4] CIOFFI M, GILLILAND D, CECONE G, et al. Electrochemical release testing of nickel-titanium orthodontic wires in artificial saliva using thin layer activation[J]. *Acta Biomaterialia*, 2005, 1(6): 717-724.
- [5] LONG M, RACK H J. Titanium alloys in total joint replacement--A materials science perspective[J]. *Biomaterials*, 1998, 19(18): 1621-1639.
- [6] LIU X, DING C. Plasma sprayed wollastonite/TiO<sub>2</sub> composite coatings on titanium alloys[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(20): 4065-4077.
- [7] LYU C, XU Z J, LU H F, et al. Modulation of the micro/nanotopography of plasma sprayed biomedical coatings for enhanced osteogenic activity[J]. *Surface Review and Letters*, 2018: 1950061.
- [8] MEI S Li, WANG H Y, CHU P K, et al. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(14): 4255-4265.
- [9] COCHIS A, AZZIMON B T, DELLA C V, et al. The effect of silver or gallium doped titanium against the multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Biomaterials*, 2016, 80: 80-95.
- [10] ZHOU L, LAI Y Z, HUANG W X, et al. Biofunctionalization of microgroove titanium surfaces with an antimicrobial peptide to enhance their bactericidal activity and cytocompatibility[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 128: 552-560.
- [11] NARBAT M K, KINDRACHUK J, DUAN K, et al. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(36): 9519-9526.
- [12] MARIA G G, CARLOS M M, MARA C F C, et al. Covalent immobilization of hLfl-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation[J]. *Acta*

- [Biomaterialia](#), 2014, 10(8): 3522-3534.
- [13] LV H B, CHEN Z, YANG X P, et al. Layer-by-layer self-assembly of minocycline loaded chitosan/alginate multilayer on titanium substrates to inhibit biofilm formation[J]. [Journal of Dentistry](#), 2014, 42(11): 1464-1472.
- [14] ZHANG F, ZHANG Z, ZHU X, et al. Silk-functionalized titanium surfaces for enhancing osteoblast functions and reducing bacterial adhesion[J]. [Biomaterials](#), 2008, 29(36): 4751-4759.
- [15] MEHDI K N, BENJAMIN F L, DING C F, et al. Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections[J]. [Biomaterials](#), 2013, 34(24): 5969-5977.
- [16] YAO X H, ZHANG X Y, WU H B, et al. Microstructure and antibacterial properties of Cu-doped TiO<sub>2</sub> coating on titanium by micro-arc oxidation[J]. [Applied Surface Science](#), 2014, 292: 944-947.
- [17] FINNEY L, VOGT S, FUKAI T, et al. Copper and angiogenesis: Unravelling a relationship key to cancer progression[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2010, 36(1): 88-94.
- [18] WU Q J, LI J H, ZHANG W J, et al. Antibacterial property, angiogenic and osteogenic activity of Cu-incorporated TiO<sub>2</sub> coating[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014(2): 6738-6749.
- [19] HEIDENAU F, MITTELMEIER W, DETSCH R, et al. A novel antibacterial titania coating: Metal ion toxicity and in vitro surface colonization[J]. [Journal of Materials Science: Materials in Medicine](#), 2005, 16(10): 883-888.
- [20] ZHANG L, GUO J Q, HUANG X Y, et al. The dual function of Cu-doped TiO<sub>2</sub> coatings on titanium for application in percutaneous implants[J]. [Journal of Materials Chemistry B](#), 2016, 4(21): 3788-3800.
- [21] LI F X, LU X H, MEI P. Progress in research on effects of metal ion dopants on crystal phase transformation of TiO<sub>2</sub>[J]. *Materials Review*, 2006, 20(9): 13-16.
- [22] LI Y P, XU X W, WANG B, et al. Research on the fluxed effect of LiF and B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>[J]. *Journal of University of Science & Technology Beijing*, 2002, 24(4): 429-431.
- [23] YANG G J, LI C J, HAN F, et al. Microstructure and photocatalytic performance of high velocity oxy-fuel sprayed TiO<sub>2</sub> coatings[J]. [Thin Solid Films](#), 2004, 466(1-2): 81-85.
- [24] TOKI S M O. Fabrication and properties of TiO<sub>2</sub> photo-catalytic coatings by thermal spraying with TiO<sub>2</sub>-Al agglomerated powder[J]. *Journal of High Temperature Society*, 2001, 27(4): 274-279.
- [25] LI G S, JIN M F, WEI G, et al. On wettability of binding phase in fluorine-bearing sinter[J]. *Iron & Steel*, 2007, 42(8): 12-16.
- [26] YAO C, WEBSTER T J, HEDRICK M. Decreased bacteria density on nanostructured polyurethane[J]. [Journal of Biomedical Materials Research Part A](#), 2014, 102(6): 1823-1828.
- [27] WANG S, ZHU W, YU P, et al. Antibacterial nanostructured copper coatings deposited on tantalum by magnetron sputtering[J]. *Materials & Processing Report*, 2015, 30(6): B120-B125.
- [28] YOSHINARI M, ODA Y, KATO T, et al. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015, 52(2): 388-394.
- [29] LI X, XU H, ZHAO B, et al. Accelerated and enhanced osseointegration of MAO-treated implants: histological and histomorphometric evaluation in a rabbit model[J]. *International Journal of Oral Science*, 2018, 10(2): 21-31.