纯钽表面微弧氧化“类骨小梁”状多孔涂层的细胞相容性

王伟强，王舒月，于凤云，王轶农

（大连理工大学，辽宁 大连 116024）

摘要：目的 提高医用纯钽的生物活性，利用微弧氧化（MAO）技术在其表面制备出“类骨小梁”状分级多孔涂层，并对比该涂层与传统“火山坑”状 MAO 涂层以及机械抛光纯钽表面在表面粗糙度、亲水性以及细胞相容性方面的差异。**方法** 使用 0.1 mol/L $Na_2B_4O_7$ 和 0.05 mol/L Na_3PO_4 电解液在纯钽表面分别制备出“类骨小梁”状及“火山坑”状多孔涂层（分别命名为 B-MAO 和 P-MAO 涂层）。采用扫描电镜、X 射线衍射以及 X 射线光电子能谱对不同结构涂层进行形貌观察和相组成分析，使用十字划格法评价涂层结合强度，使用激光共聚焦显微镜测定涂层的表面粗糙度，使用接触角仪测量其亲水性，并将小鼠前成骨细胞（MC3T3-E1）接种于材料表面，对比不同形貌状态对细胞铺展、增殖以及成骨分化的影响。**结果** MAO 涂层物相主要为 Ta_2O_5。B-MAO 涂层由于内部孔隙度高，应力释放充分，涂层结合强度高，而 P-MAO 涂层则因具有分层现象和较大的残余应力，易从基体剥落。抛光纯钽表面、P-MAO、B-MAO 涂层表面的粗糙度分别为 0.06、1.50、1.58 μm，与之相应的接触角分别为 42.6°、15.5°、7.2°。细胞初期粘附结果表明，MAO 涂层表面细胞数量多于抛光纯钽表面，且 B-MAO 涂层细胞铺展能力优于 P-MAO 涂层和抛光钽表面。CCK-8 测试结果表明，细胞数量随时间逐渐增加，MAO 组细胞增殖能力好于抛光组，B-MAO 组细胞增殖能力最优。ALP 活性方面，B-MAO 组也高于 P-MAO 和抛光组。**结论** MAO 涂层相较于抛光纯钽表面具有更高的粗糙度以及亲水性，从而具有高的细胞粘附和增殖能力。“类骨小梁”状分级多孔涂层由于具有更高的结合强度和超亲水性，在细胞铺展、增殖以及成骨分化能力高于“火山坑”状单级多孔涂层，在硬组织替代领域具有较大应用潜力。

关键词：钽；微弧氧化；四硼酸钠；多孔涂层；亲水性；细胞相容性

中图分类号：TB34 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-3660(2023)04-0363-11

DOI：10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2023.04.032

Cytocompatibility of "Trabecular Bone-like" Porous Coating Prepared by Micro-arc Oxidation on Pure Tantalum

WANG Wei-qiang, WANG Shu-yue, YU Feng-yun, WANG Yi-nong

(Dalian University of Technology, Liaoning Dalian 116024, China)

ABSTRACT: Tantalum is widely used as a biomedical implant material, but the bioinert of its surface may affect its bonding

收稿日期：2022–04–04；**修订日期：**2022–05–24

Received：2022-04-04；**Revised：**2022-05-24

作者简介：王伟强（1974—），男，博士，副教授，主要研究方向为医用金属材料。

Biography：WANG Wei-qiang (1974-), Male, Doctor, Associate professor, Research focus: biomedical metallic materials.

引文格式：王伟强，王舒月，于凤云，等. 纯钽表面微弧氧化“类骨小梁”状多孔涂层的细胞相容性[J]. 表面技术, 2023, 52(4): 363-373.
WANG Wei-qiang, WANG Shu-yue, YU Feng-yun, et al. Cytocompatibility of "Trabecular Bone-like" Porous Coating Prepared by Micro-arc Oxidation on Pure Tantalum[J]. Surface Technology, 2023, 52(4): 363-373.

with bone tissue. To improve the bioactivity of tantalum, researchers usually treat it with surface modification, among which micro-arc oxidation (MAO) is an effective method. The MAO can prepare a ceramic coating with a porous structure and high coating adhesion. Meanwhile, it can easily incorporate some bioactive elements into the coating. In this work, a novel "trabecular bone-like" hierarchical porous coating was prepared on the tantalum surface by MAO to improve its bioactivity. The difference between this coating and the conventional "crater-like" MAO coating as well as the mechanically polished pure tantalum surface was compared in terms of surface roughness, hydrophilicity, cytocompatibility, etc. A tantalum rod (>99.9 wt%) with a diameter of 10 mm was cut into tantalum sheets with a thickness of 2 mm. All tantalum sheets were polished with emery paper and cleaned in an ultrasonic cleaner. The MAO was conducted with a bipolar pulse power supply with a constant current model. The frequency and duty circle were set at 600 Hz and 9%, respectively. The "trabecular bone-like" porous coatings (appointed as B-MAO coatings) were prepared on tantalum sheets with 0.1 M $Na_2B_4O_7$ electrolyte with the work current set to 4 A. The "crater-like" porous coatings (appointed as P-MAO coatings) were prepared on tantalum sheets with 0.05 M Na_3PO_4 electrolyte with the work current set to 12 A. Scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were used to observe the coating's morphology and to analyze the coating's phase composition. The coating adhesion was evaluated through the cross-scratch method. Their surface roughness was analyzed with confocal laser scanning microscopy (CLSM). The surface hydrophilicity was measured with a contact angle (CA) meter. And mouse preosteoblasts (MC3T3-E1) were seeded on the surface of the materials to compare the effects of different surface morphology on cell spreading, proliferation, and osteogenic differentiation. The XRD results showed that the phase composition of the MAO coating was mainly Ta_2O_5. The B-MAO coating had a high internal porosity, which resulted in adequate stress relief and thus high bonding strength. In contrast, the P-MAO coating was easy to peel off from the substrate due to the delamination and the significant residual stress. The roughness (R_a) of the polished pure tantalum surface, the P-MAO and B-MAO coatings were 0.06, 1.50 and 1.58 μm. Their corresponding contact angles were 42.6°, 15.5° and 7.2° respectively. The initial cell adhesion results indicated that the number of cells on the MAO coatings was more than those on the polished pure tantalum surface, and the spreading ability of cells on the B-MAO coating was better than those on the P-MAO coating and polished tantalum surfaces. The results of CCK-8 test showed that the number of cells increased gradually with time. The proliferation ability of cells in the MAO group was better than those in the polishing group, and the B-MAO group showed the best proliferation ability. The B-MAO group was also higher than the P-MAO and polished tantalum groups in terms of ALP activity. In conclusion, the MAO coatings exhibit higher roughness as well as hydrophilicity than the polished pure tantalum surface, resulting in high cell adhesion and proliferation ability. Compared with the "crater-like" single porous coating, the "trabecular bone-like" hierarchical porous coating has great potential for applications in hard tissue replacement due to its higher bonding strength, superhydrophilicity, and higher cell spreading, proliferation and osteogenic differentiation ability.

KEY WORDS: tantalum; micro-arc oxidation; $Na_2B_4O_7$; porous coating; hydrophilicity; cytocompatibility

钽由于其优异的生物相容性、耐蚀性及良好的力学性能被广泛地应用于医用植入材料领域[1-2]。其中多孔钽的形状与人体骨小梁的结构相似，被称为骨小梁金属，其特点是弹性模量较低，介于人体皮质骨和松质骨之间，与人体骨组织相接近的弹性模量可以有效降低人体应力屏蔽效应[3-5]。多孔钽的孔隙率在75%~80%，高的孔隙率使其具有良好的渗透性，更高的组织向内生长潜力，有利于骨整合[6-7]。多孔钽目前主要应用于股骨头坏死、关节置换、骨缺损等领域[8-9]。

钽高稳定的化学性质（生物惰性）会延迟其与骨组织的有效结合，有可能是植入物松动的主要原因[10]。因此需要对钽进行表面改性，提高其生物活性。提高生物材料表面活性的方法有引入活性元素[11-12]和改善表面粗糙度等[13-14]。其中，微弧氧化（MAO）作为一种重要的表面改性方法，既可以改善表面粗糙度，也可以方便地引入活性元素[15-16]。如 Li 等[17]使用微弧氧化方法在纯钛表面制备出多孔粗糙的 TiO_2 涂层的同时，成功将活性元素 Ca 和 Sr 引入涂层，并证明了这种涂层提高了成骨细胞在其表面的粘附和铺展性能。另外，以原位生长为特征的微弧氧化涂层与基体的结合力好，耐磨性以及耐腐蚀性高，涂层功能及结构的设计性优，处理复杂器件内外表面的能力强[18-20]。

在制备植入物时，减少植入物和人体自然骨的差异可以增强骨植入的效果，利用仿生原理构建微纳米分级结构为当前趋势之一。微米/纳米分级结构可以调控成骨细胞的粘附、增殖、分化，有利于成骨基因的表达[21-22]。有研究证明，植入体表面与细胞尺寸相当的微米尺度结构可以增强细胞与植入体的接触面积，影响细胞的粘附和铺展，进而影响细胞的增殖以

及成骨分化能力[23]。纳米尺度的结构则是对应于蛋白质和骨矿物质的尺寸，表面纳米尺度结构可以增加蛋白质粘附的位点，进而直接增强细胞粘附、增殖和分化能力[24]。微弧氧化表面改性方法可以在纯钛的表面制备出微米级沟槽与亚微米以及纳米级孔洞结合的涂层，该涂层在后续生物实验中同样被证明具有优异的成骨分化能力以及骨整合能力[25]。

关于纯钽表面微弧氧化处理以提高其生物活性的工作也有报道。Cheng 等[26]使用硅酸盐对纯钽进行了微弧氧化，在涂层中引入 Si 元素，提高了材料表面的生物活性。Wang 等[27]则在醋酸钙和 β 甘油磷酸钙中进行了微弧氧化，将 Ca 和 P 掺入了涂层，并探究了涂层形貌、生长行为等随微弧氧化时间的变化。李振宗等[28]在硅酸盐以及磷酸盐体系中对多孔钽进行了微弧氧化，之后进行了碱处理。结果表明，复合处理后，由于在 Ta_2O_5 表面引入了羟基功能团，使之具有优异的生物相容性和成骨性能。

上述针对纯钽微弧氧化所获得的涂层结构多为单级“火山坑”状结构，且研究的重点是如何在其表面引入活性元素或活性基团，而不同微弧氧化形貌结构对其活性的影响关注较少。本研究组在近期工作中成功利用四硼酸盐电解液在纯钽表面制备出“类骨小梁”状多孔分级涂层，为探究该仿生结构涂层对纯钽生物活性的影响，并比较不同形貌状态在细胞相容性上的差异，本文以纯钽抛光态表面为参照，对比分析了该涂层与“火山坑”状微弧氧化涂层在涂层物相组成、涂层结合力、粗糙度和亲水性指标上的差异，并表征了小鼠前成骨细胞在 3 种表面上的铺展、增殖和成骨分化的能力。

1　材料和方法

1.1　样品制备

采用线切割将钽棒切为 ϕ10 mm×2 mm 的钽片，并依次使用#200、#400、#800、#1000 的砂纸打磨干净，然后分别使用丙酮、酒精、去离子水进行超声清洗。微弧氧化所用电源为双极性脉冲电源（WHD-20，哈尔滨工业大学）。实验使用清洗好的钽片作为阳极，使用不锈钢容器作为阴极。电解液选用 0.1 mol/L $Na_2B_4O_7$，对应的样品命名为 B-MAO。电源参数设置为恒流 4 A，占空比为 9%，频率为 600 Hz。为了对比不同微弧氧化形貌对细胞相容性的影响，本实验选取 0.05 mol/L Na_3PO_4 电解液制备的样品（P-MAO）作为对照组，对照组电源参数设置为恒流 12 A，占空比为 9%，频率为 600 Hz。反应过程中使用机械搅拌进行散热。

1.2　涂层形貌以及物相表征

对涂层的表面以及截面使用扫描电镜（SEM，Supra55，Zeiss，德国）进行分析。使用 X 射线衍射仪（XRD，Empyrean，PANalytical B.V，荷兰），在 40 kV 下用 Cu-Kα 辐照（λ=0.154 056 nm），步长为 0.04°，扫描（2θ）范围为 20°~ 80°，确定涂层的相结构。使用 X 射线光电子能谱（XPS，ESCALAB XI+，Thermo，英国）对涂层的化学价态进行分析。XPS 测试采用 Al-Kα 辐射源（$h\upsilon$=1 486.6 eV），测试之前，通过氩离子束蚀刻样品表面 1 min，以减少可能的碳污染，以 C1s（284.8 eV）作为基准峰校准所有能量值。XPS 结果通过 XPSpeak 4.1 软件进行分峰拟合。

1.3　涂层结合力测试

使用十字划格附着力测试仪来测定微弧氧化涂层与基体之间的结合力，测试方法为 ASTM 法（ASTM D3359-B），该测试方法适用于金属基体。首先是在涂层的表面使用均匀的压力划出切口，该切口沿 2 个相互正交的方向，并确保切口深度需达到基体的表面。划出切口后使用软刷刷去涂层表面脱落物。通过对比 ASTM 法评级标准，评估涂层附着力等级，使用 SEM 记录切口表面形貌。

1.4　表面粗糙度和亲水性测试

使用三维激光共聚焦扫描显微镜（CLSM，OLS4000，Olympus，日本）测量样品表面的三维立体特征，并且在 20 倍的物镜下测量涂层表面的粗糙度。使用接触角仪（DSA100，KRÜSS，德国）测量样品的水接触角，使用 2 μL 的水滴，选取水滴接触涂层后 240 ms 的接触角。实验选取样品各 5 个，并分别在样品表面选取 5 个点进行测试，并舍去差异较大的点，然后计算平均值。

1.5　细胞相容性测试

1.5.1　细胞培养

本试验采用小鼠前成骨细胞（MC3T3-E1，中国科学院细胞库）直接接触培养，所用培养基为 α-MEM 完全培养基，其由 α-MEM 培养基（索莱宝科技有限公司，北京）添加 10%胎牛血清（FBS）和 1%的双抗（100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素硫酸盐）配制而成。细胞培养箱（HERAcell 150i，Thermo Scientific，德国）保持 37 ℃恒温以及含有 5%二氧化碳的气体环境，细胞培养过程中，每 2~3 d 更换完全培养基，细胞长至培养瓶 80%左右进行细胞传代。

1.5.2　样品准备

将微弧氧化后以及抛光的样品进行灭菌处理。首先将样品超声清洗 15 min，然后将清洗完毕的样品在 120 ℃的高温灭菌器中高温高压灭菌 30 min，取出后放进真空干燥箱中进行干燥，干燥后的样品取出后两面分别于紫外光下照射 12 h。灭完菌后的样品放置于无菌操作台中备用。

1.5.3　细胞铺展

以 2×10^4 /mL 的密度将细胞接种至样品涂层表面，在二氧化碳培养箱中分别培养 1、2、4 h，使用鬼笔环肽荧光素（FITC，碧云天生物技术有限公司，上海）进行细胞骨架染色，染色后的细胞 F 型肌动蛋白表现出绿色荧光，然后通过荧光显微镜（BX51，Olympus，日本）进行细胞初期铺展情况观察。以 2×10^4 /mL 的细胞密度将细胞接种至样品表面，在二氧化碳培养箱中分别培养 2、4、24 h 后，使用 4%多聚甲醛对细胞进行固定，使用梯度浓度乙醇（质量分数分别为 30%、50%、70%、80%、90%、100%）对细胞进行脱水，在室温下干燥后，使用 SEM 观察涂层结构对细胞铺展情况的影响。

1.5.4　细胞增殖

以 2×10^4 /mL 的密度将细胞接种至样品涂层表面，培养 1、3、5 d 后，加入细胞计数试剂盒（CCK-8，索莱宝科技有限公司，北京），在恒温下培养 3.5 h，然后将培养后的液体转移至 96 孔板中，使用酶标仪（Synergy H1，Thermo Scientific，美国）检测其在 450 nm 波长下的吸光度。吸光度与细胞数量和活性具有线性关系。

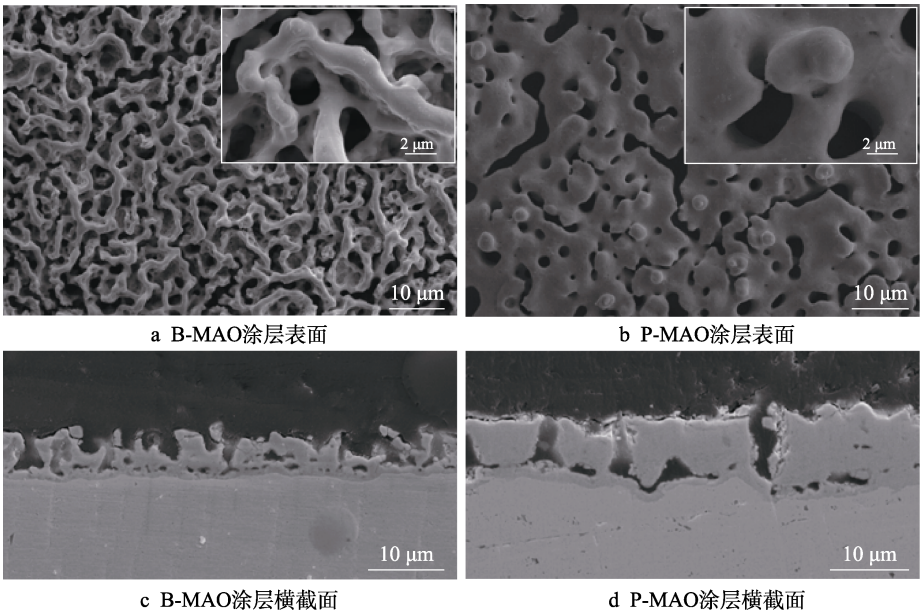
1.5.5　碱性磷酸酶活性（ALP 活性）

ALP 是细胞早期成骨标志物，其活性大小与已成骨分化细胞的含量正相关。使用 ALP 检测试剂盒（碧云天生物技术有限公司，上海）对其成骨分化能力进行测定，以 2×10^4 /mL 的密度将细胞接种至样品表面，在完全培养基中培养 3 d 后，移除培养基，然后使用成骨诱导培养基继续培养，每 3 d 更换一次成骨诱导培养基。培养 7、14 d 后，将细胞裂解上清液与 ALP 显色液一起培养 30 min，并且将标准品和空白对照分别培养 30 min，后加入反应终止液终止反应，然后测定在 405 nm 波长下的吸光度。通过吸光度计算 ALP 活性。

2　结果与讨论

2.1　涂层形貌分析

B-MAO 和 P-MAO 涂层表面和横截面的微观形貌如图 1 所示。可以看出，B-MAO 表面呈现出“类骨小梁”状多孔特征（见图 1a）。“骨小梁”的厚度约为 2 μm，“骨小梁”状结构之间形成较大尺寸的微米级沟槽（槽宽 5~8 μm），在沟槽内部还分布着小尺寸的微米级孔洞（孔径在 2 μm 左右）。结合涂层横截面形貌（见图 1c）可以看出，涂层内部也存在较多更小尺寸的孔洞，这说明 B-MAO 涂层在膜厚方向上具有分级结构特征。与之对比，P-MAO 涂层表面形貌（见图 1b）呈现出典型的“火山坑”状多孔特征，孔的尺寸在 3 μm 左右，有少量孔洞互连后形成沟槽，但相对来说其孔洞的形态和尺寸比较单一。P-MAO 横截面形貌（见图 1d）则显示出典型的微弧放电通道特征，放电通道以外区域和 B-MAO 涂层相比，孔洞较少，比较致密。从形貌上看，在纯钽表面利用 $Na_2B_4O_7$ 电解液获得的 MAO 涂层的孔隙率要高于利用 Na_3PO_4 制备的 MAO 涂层，出现这样的效果可能与四硼酸盐电解质对涂层微弧放电产物具有较强溶解作用有关[25]。



a B-MAO涂层表面　　b P-MAO涂层表面

c B-MAO涂层横截面　　d P-MAO涂层横截面

图 1　涂层表面及横截面形貌

Fig.1 Surface and cross section of coatings: a) surface of B-MAO coating; b) surface of P-MAO coating; c) cross section of B-MAO coating; d) cross section of P-MAO coating

2.2　涂层物相分析

B-MAO 与 P-MAO 涂层的 XRD 谱图见图 2，为了对比，图中也给出了微弧氧化前纯钽的 XRD 谱图。对照标准 PDF 卡片可知，B-MAO 与 P-MAO 涂层的主要物相为 Ta_2O_5（PDF# 71-0639）。因为涂层的孔隙度高，X 射线穿透深度较深，2 种涂层谱图中均出现了基底纯 Ta（PDF# 04-0788）的衍射峰。

涂层表面的 XPS 分析结果如图 3 所示。其中，图 3a—d 为 B-MAO 的 XPS 分析结果，图 3a 为总谱，图 3b、c、d 分别为 Ta4f、O1s、B1s 的详细谱及分峰拟合结果。Ta4f 在结合能 25.80、27.69 eV 处存在 2 个特征峰，自旋分裂轨道为 1.9 eV，这与 Ta^{5+}的 $Ta4f_{5/2}$ 和 $Ta4f_{7/2}$ 特征峰吻合，接近 Ta_2O_5 的结合能[29]，但存

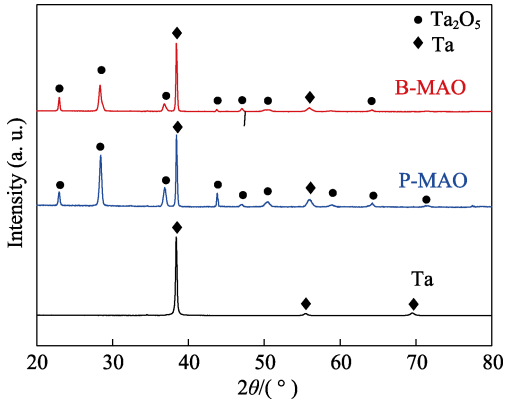


图 2　B-MAO、P-MAO 涂层和纯 Ta 的 XRD 谱图
Fig.2 XRD patterns of B-MAO, P-MAO coatings and pure Ta

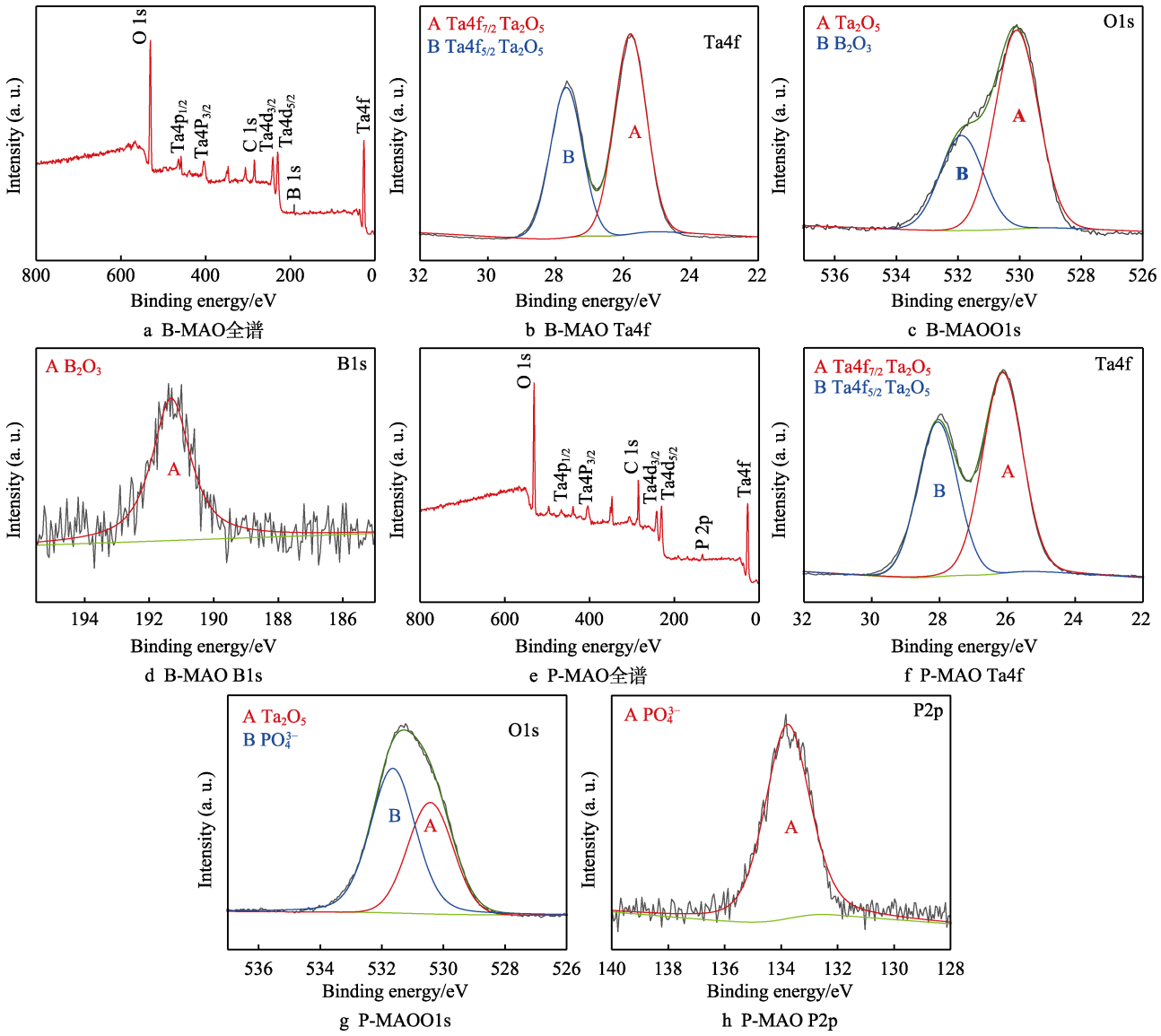
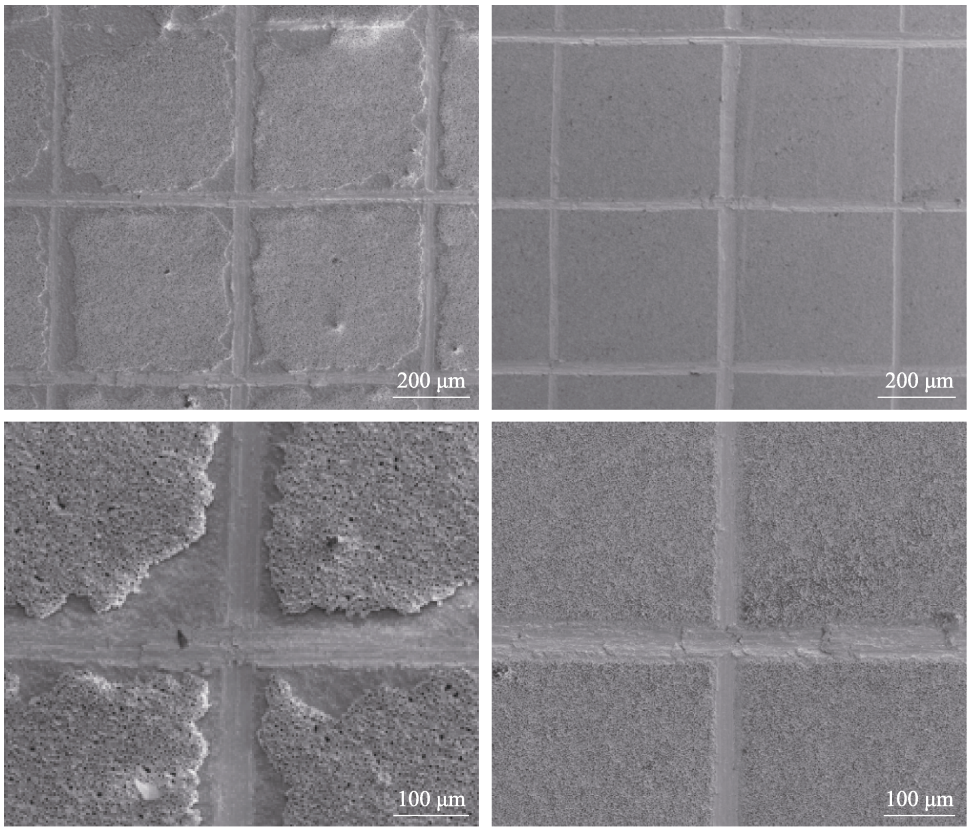


图 3　B-MAO 和 P-MAO 涂层的 XPS 图谱
Fig.3 XPS spectra of B-MAO and P-MAO coatings: a) B-MAO full spectra; b) B-MAO Ta4f; c) B-MAO O1s; d) B-MAO B1s; e) P-MAO full spectra; f) P-MAO Ta4f; g) P-MAO O1s; h) P-MAO P2p

在一定程度的偏移（见图 3b）。结合能为 530.06 eV 的特征峰则与 Ta_2O_5 的 O1s 结合能一致，证明了涂层表面 Ta 以 Ta_2O_5 的形式存在[30]（见图 3c）。有研究表明，微弧氧化涂层表面会存在一层非晶层[25]，此处，Ta_2O_5 的 Ta4f 峰位向更高结合能方向产生偏移，可能是涂层表面形成的 Ta_2O_5 为非晶态所致[31]。O1s 中键能较高的峰位（531.64 eV）对应于 B_2O_3[32]，B1s 峰位（191.52 eV）对应的是 B_2O_3，说明在 B-MAO 涂层中 B 以 B_2O_3 的形式存在（见图 3d）。图 2 中 XRD 未检测到 B_2O_3 衍射峰，推测涂层中 B_2O_3 应来自于 $Na_2B_4O_7$ 电解质的热分解，且主要以非晶的形式在表面少量存在[25]。图 3e—h 为 P-MAO 的 XPS 分析结果。其中，图 3e 为 XPS 总谱，图 3f、g、h 分别为 Ta4f、O1s、P2p 的详细谱及分峰拟合结果。Ta4f 在结合能 26.14、28.05 eV 处同样存在 2 个特征峰，自旋分裂轨道近似为 1.9 eV，与 Ta_2O_5 的结合能也存在一定的偏移（见图 3f），但考虑到在 O1s 详图中能够拟合出 Ta_2O_5（530.43 eV）特征峰（见图 3g），可以确定 P-MAO 涂层中 Ta 以 Ta_2O_5 的形式存在。O1s 中键能较高的峰位（531.43 eV）对应于 PO_4^{3-}，结合 P2p 在 133.78 eV 处的峰位（见图 3h），证明了 P 以 PO_4^{3-} 的形式存在。这说明在 P-MAO 涂层微弧氧化制备过程中，由于涂层表面液体的急速冷却，使得少量 Na_3PO_4 电解质以非晶态沉积在涂层表面。

2.3　涂层结合强度测试

十字划格测试后 2 种涂层切口的 SEM 形貌如图 4 所示。可以看出，P-MAO 表面十字交叉部位有大片脱落，是涂层内部发生了开裂，说明涂层的结合力较差。B-MAO 表面脱落现象不明显，切口比较平齐。根据 ASTM 法评级标准，P-MAO 脱落面积在 15%~35%，评级达到 2B，而 B-MAO 划线边缘光滑，交叉点无涂层脱落，评级达到最高级 5B。上述事实说明 B-MAO 涂层的结合力要优于 P-MAO 涂层。对涂层横截面形貌进行分析可知（见图 1），2 种涂层的内层和基体结合位置处均有一层相对较薄的致密层，致密层往外则是具有较多孔洞的中间疏松层。基体与涂层界面处的致密层因为是原位生长，与基体结合强度较高，也就说涂层与基体结合处发生开裂从而剥落的可能性较低。分析 P-MAO 涂层易从内部开裂的原因：一方面可能是涂层的结合力与承载面积有关，相较 B-MAO 涂层，P-MAO 涂层的中间疏松层有较大的孔洞，使得涂层内部出现分层现象，承载面积缩减，从而使得在十字划格过程中涂层内部产生剥离并大面积脱落；另一方面，B-MAO 表面的高孔隙度结构有助于释放微弧氧化过程中产生的热应力以及体积



a P-MAO　　b B-MAO

图 4　十字划格试验后 P-MAO 和 B-MAO 涂层表面切口的 SEM 形貌
Fig.4 SEM images of the P-MAO and B-MAO coating surface after the cross-scratch test: a) P-MAO; b) B-MAO

应力，而 P-MAO 表面的涂层孔隙度较低，涂层相对致密，在微弧氧化冷却过程中易形成残余应力，从而在十字划格过程中因内应力较大产生剥离[33]。

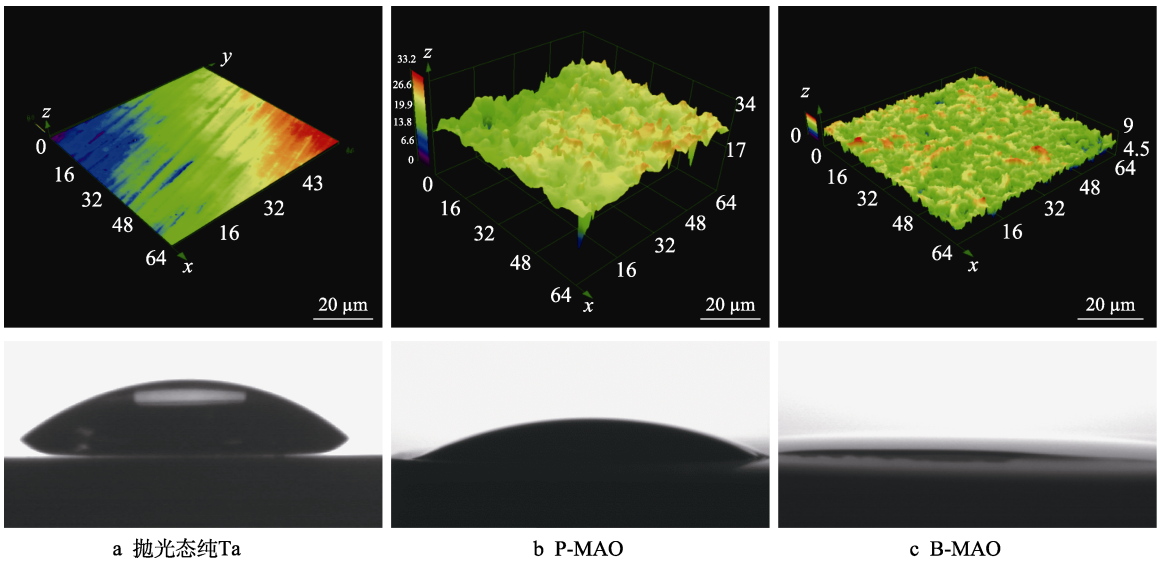
2.4　不同表面粗糙度与亲水性

适宜的植入体表面粗糙度可促进更早、更强的骨整合，粗糙的表面是增强植入体与骨组织接触面积以及骨组织向内增长的潜力，并且成骨细胞对粗糙的表面有更好的附着能力[34-35]。使用激光共聚焦显微镜测量出的不同样品表面的三维轮廓如图 5 所示。粗糙度测量结果显示，机械抛光纯钽的 Ra=0.06 μm，P-MAO 涂层的 Ra=1.50 μm，B-MAO 涂层的 Ra=1.58 μm。说明 B-MAO 和 P-MAO 表面均为粗糙表面，均高于机械抛光纯钽，而且 B-MAO 表面的“类骨小梁”状多孔结构的粗糙度高于 P-MAO 表面。

提高植入物表面的亲水性可以有效刺激植入物和人体生物环境的交互作用，改善蛋白质、细胞等的粘附，从而促进骨整合[36-37]。亲水性可以用水接触角的大小来表示，接触角越小则亲水性越好。经测量，Ta、P-MAO 和 B-MAO 的接触角分别为 42.6°、15.5° 和 7.2°。可以看出，B-MAO 的接触角低于 P-MAO，两者的接触角又明显小于抛光 Ta，说明微弧氧化后涂层的亲水性优于抛光纯 Ta 的亲水性。B-MAO 的接触角小于 10°，具有超亲水性特征，说明在 B-MAO 表面制备的“类骨小梁”状分级多孔结构对涂层亲水性的提高有一定的促进作用。有研究表明，接触角随样品表面粗糙度的变化而变化，在理想情况下满足 Wenzel 模型：$\cos\theta_m = r\cos\theta_\gamma$。式中：$\theta_m$ 为测量所得接触角；θ_γ 为材料的杨氏接触角；r 为粗糙度因子（实际的固液接触面积与表观固液接触面积之比，r>1，与粗糙度大小有关）[38]。上述理论意味着，对于本征亲水性（杨氏接触角小于 90°）的表面，粗糙的表面对其亲水性有放大作用。此处，2 种微弧氧化涂层的成分均为具有极性的 Ta_2O_5，其本身是亲水性的，因此粗糙的微弧氧化涂层的亲水性明显好于抛光纯 Ta，而 B-MAO 涂层的粗糙度又大于 P-MAO 涂层，所以其亲水性理论上要更优。另外，相较于 P-MAO 分立的孔洞结构，B-MAO 的“类骨小梁”状涂层表面沟槽状特征明显，孔洞更为互连联通，其较强的毛细作用能进一步增加其亲水性，使其达到超亲水性状态。

2.5　不同表面细胞相容性

细胞在纯 Ta、P-MAO 和 B-MAO 表面培养 1、2、4 h 后的荧光染色图像如图 6 所示。1 h 时，在 3 种形貌表面细胞均呈现圆形，且 P-MAO 和 B-MAO 涂层表面的细胞数量多于 Ta 表面细胞数量，说明初期 P-MAO 和 B-MAO 涂层的细胞粘附能力高于抛光 Ta。随着时间的增加，细胞逐渐在表面铺展，且在 2 h 时细胞形态发展为多边形，部分细胞有伪足出现。4 h 时，细胞伪足进一步扩展，丝状伪足增多。说明前期纯 Ta 表面、P-MAO 和 B-MAO 涂层均具有良好的细胞铺展性能。图 6b 为细胞铺展的 SEM 形貌图像，通过观察可进一步对比表面结构对细胞铺展及粘附的影响。2 h 培养的 SEM 图像中，B-MAO 相较于 P-MAO 细胞粘附数量较多，并且在 4 h 时，B-MAO 细胞形貌出现了明显的变化，伪足数量较多。在较长的 24 h 时间点上，B-MAO 涂层表面细胞铺展已经比较充分，且 B-MAO 涂层的细胞铺展能力优于 P-MAO 涂层和抛光纯 Ta 表面。Fiedler 等[39]研究认为，不同的表面结构会使得细胞膜上的肌动蛋白纤维产生不同的应力，进而有不同的铺展速度。本文 B-MAO 表面相较于 P-MAO 表面更有利于细胞丝状伪足的延伸与铺



a 抛光态纯Ta　　b P-MAO　　c B-MAO

图 5　不同表面的 3D 形貌和水接触角测试结果

Fig.5 3D morphology and water contact angel images of different surfaces: a) polished pure Ta; b) P-MAO; c) B-MAO

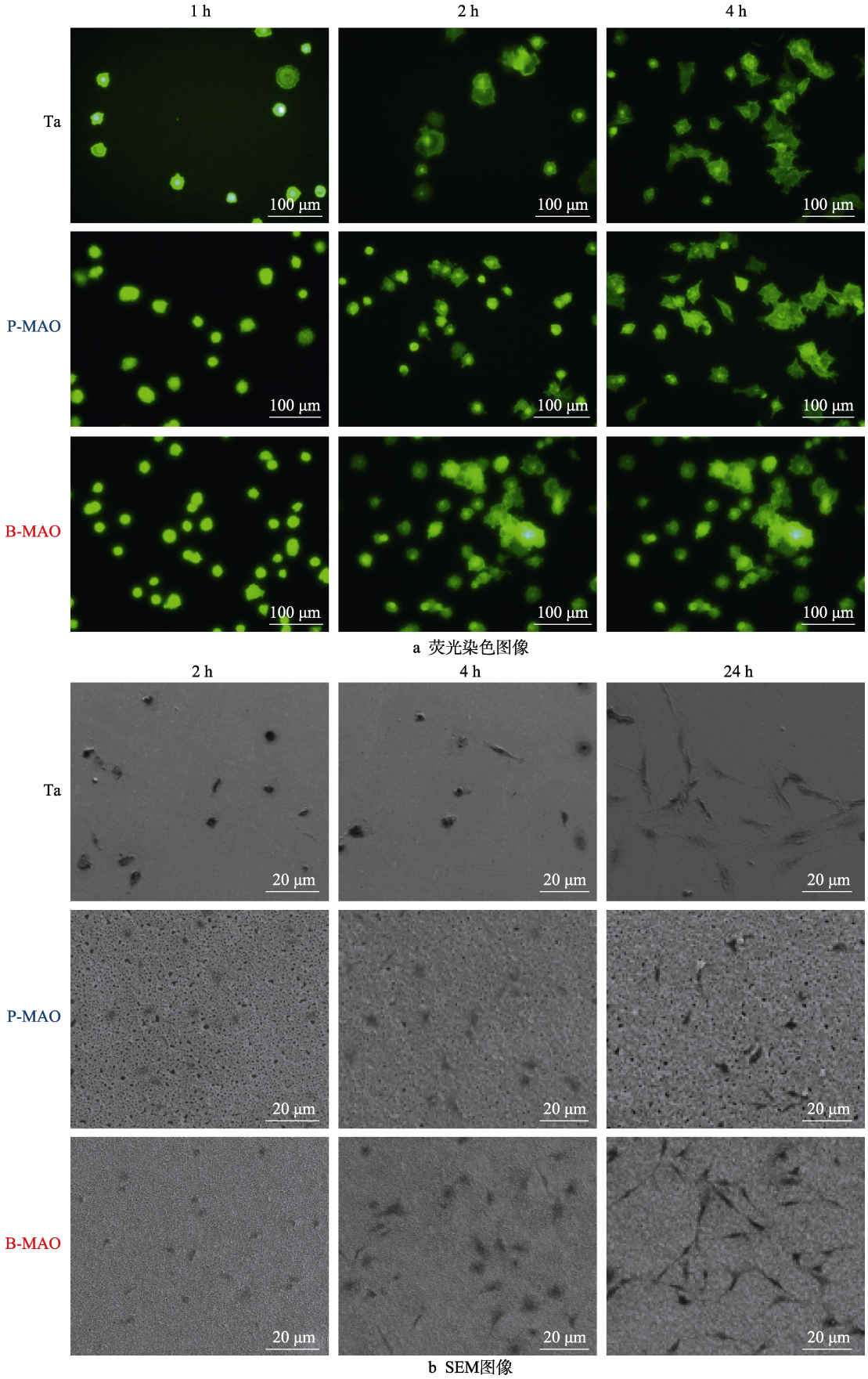


图 6　细胞在 Ta、P-MAO、B-MAO 表面上培养不同时间的荧光染色图像和 SEM 图像

Fig.6 Fluorescence staining images (a) and SEM images (b) of cells cultured for various times on the Ta, P-MAO and B-MAO surfaces

展，应该与其独特的“类骨小梁”状分级多孔结构有关。

细胞在 Ta、P-MAO 和 B-MAO 涂层表面培养 1、3、5 d 的 CCK-8 检测结果如图 7 所示。由结果可知，3 种形貌表面的细胞数量随着时间的增加均呈明显增加趋势，说明 3 种表面均没有细胞毒性。细胞培养 1 d 时，3 种表面的细胞增殖能力排序为 B-MAO>P-MAO>Ta，P-MAO 和 Ta 表面细胞增殖存在统计学上差异（$p<0.05$），B-MAO 和 P-MAO 则存在显著性差异（$p<0.01$）。3 d 时，这种差异继续存在，不过 B-MAO 和 P-MAO 之间的差异稍微降低（$p<0.05$）。5 d 时，B-MAO 的细胞增殖能力最优，与 P-MAO、纯 Ta 的差异性显著（p 值分别小于 0.001 和 0.01）。虽然 5 d 时纯 Ta 的细胞增殖能力要好于 P-MAO，但它们之间不存在统计学上差异（$p>0.05$）。分析出现这种现象的原因可能是在长时间的细胞培养情况下，单级结构和抛光 Ta 表面细胞均已铺满，而在 B-MAO 表面形成的明显纵向分级结构下，细胞有向内生长的趋势，更有利于细胞在涂层上生长。有研究表明，比表面积大、联通性较高的形貌有助于细胞的粘附、增殖[40]，这与本实验观察到的结果相符。

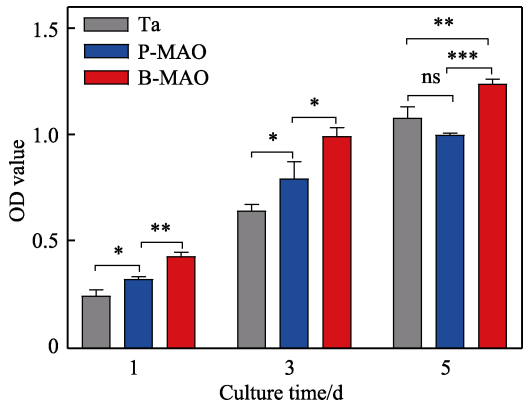


图 7　Ta、P-MAO 和 B-MAO 表面在 1、3、5 d 时的 CCK-8 法细胞增殖能力测试（ns $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$）

Fig.7 Cell proliferation measured by CCK-8 for Ta, P-MAO and B-MAO surfaces at 1, 3, and 5 days (ns $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$)

细胞成骨诱导 7、14 d 后，Ta、P-MAO 和 B-MAO 表面 ALP 活性定量结果如图 8 所示。可以看出，随着时间的增加，细胞在不同形貌表面的 ALP 活性均明显增加，在 7、14 d 时，Ta 和 P-MAO 涂层表面的 ALP 活性没有统计学上差异，但在 14 d 时，P-MAO 涂层 ALP 平均值要好于纯 Ta。2 个时间点上，B-MAO 涂层的 ALP 活性均表现最优，与前两者具有显著性差异。有研究表明，粗糙度高的表面有利于细胞分化[41]，本文的结果也验证了这一点。对比 B-MAO 和 P-MAO 可知，两者表面化学组成相似，导致两者 ALP 活性存在差异的原因可能是其表面结构的不同。由于 ALP 是细胞早期成骨标志物，因此上述结果可以说明，相较于 P-MAO 的单级结构，B-MAO 涂层形成的多孔分级结构更能促进细胞成骨分化。

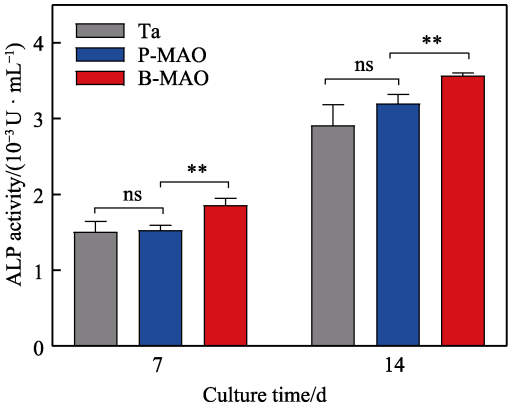


图 8　MC3T3-E1 细胞成骨诱导 7、14 d 后 Ta、P-MAO 和 B-MAO 表面 ALP 活性（ns $p>0.05$, ** $p<0.01$, $n=3$）

Fig.8 ALP activity after MC3T3-E1 osteogenic induction for 7 and 14 days on Ta, P-MAO and B-MAO surfaces (ns $p>0.05$, ** $p<0.01$, $n=3$)

3　结论

1）使用微弧氧化方法，并利用 $Na_2B_4O_7$ 和 Na_3PO_4 电解液在纯钽表面分别制备出了“类骨小梁”状分级多孔和“火山坑”状单级多孔涂层，2 涂层组成成分主要为 Ta_2O_5。

2）微弧氧化涂层相较于机械抛光态纯钽表面具有更高的粗糙度以及亲水性，同时具有更高的细胞粘附和增殖能力。

3）相较于“火山坑“状涂层，“类骨小梁”状多孔涂层的结合力更强，具有更高的粗糙度以及超亲水特性，在细胞粘附、铺展、增殖以及成骨分化能力方面性能优异，在硬组织替代领域应用具有较大的潜力。

参考文献：

[1] ZHAO De-wei, LI Jun-lei. Fabrication of the Porous Tantalum and Its Current Status Used as Orthopedics Implants Materials[J]. Acta Metallurgica Sinica, 2017, 53: 1303-1310.

[2] BOUREAU F, PUTMAN S, ARNOULD A, et al. Tantalum Cones and Bone Defects in Revision Total Knee Arthroplasty[J]. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2015, 101(2): 251-255.

[3] WAUTHLE R, VAN DER STOK J, AMIN YAVARI S, et al. Additively Manufactured Porous Tantalum Implants[J]. Acta Biomaterialia, 2015, 14: 217-225.

[4] LEVINE B R, SPORER S, POGGIE R A, et al. Experimental and Clinical Performance of Porous Tantalum in Orthopedic Surgery[J]. Biomaterials, 2006, 27(27):

4671-4681.

[5] NIINOMI M, NAKAI M, HIEDA J. Development of New Metallic Alloys for Biomedical Applications[J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8(11): 3888-3903.

[6] WELLDON K J, ATKINS G J, HOWIE D W, et al. Primary Human Osteoblasts Grow into Porous Tantalum and Maintain an Osteoblastic Phenotype[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008, 84(3): 691-701.

[7] ARABNEJAD S, BURNETT JOHNSTON R, PURA J A, et al. High-Strength Porous Biomaterials for Bone Replacement: A Strategy to Assess the Interplay between Cell Morphology, Mechanical Properties, Bone Ingrowth and Manufacturing Constraints[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 30: 345-356.

[8] COHEN R. A Porous Tantalum Trabecular Metal: Basic Science[J]. American Journal of Orthopedics (Belle Mead, N J), 2002, 31(4): 216-217.

[9] VULETIĆ M, PELIVAN I, GABRIĆ D. Implant Prosthodontic Rehabilitation after Surgical Treatment for an Oropharyngeal Malignant Tumour Using Tantalum Dental Implants[J]. Case Reports in Dentistry, 2021, 2021: 5585181.

[10] LIU Yin-dong, BAO Chong-yun, WISMEIJER D, et al. The Physicochemical/Biological Properties of Porous Tantalum and the Potential Surface Modification Techniques to Improve Its Clinical Application in Dental Implantology[J]. Materials Science and Engineering: C, 2015, 49: 323-329.

[11] 刘元才, 徐铁伟, 张珊珊, 等. 锶含量对 Ti-15Mo 合金微弧氧化膜层及其磷灰石诱导能力的影响[J]. 表面技术, 2022, 51(1): 287-295.
LIU Yuan-cai, XU Tie-wei, ZHANG Shan-shan, et al. Effect of Strontium Content on Micro Arc Oxidation Coating and the Apatite Inducing Ability of Ti-15Mo Alloy[J]. Surface Technology, 2022, 51(1): 287-295.

[12] ZHANG Xin-xin, LV You, FU Shan, et al. Synthesis, Microstructure, Anti-Corrosion Property and Biological Performances of Mn-Incorporated Ca-P/TiO_2 Composite Coating Fabricated via Micro-Arc Oxidation[J]. Materials Science and Engineering: C, 2020, 117: 111321.

[13] 冯唯, 魏大庆, 王槐豪, 等. 微弧氧化生物活性 TiO_2 基纳米结构表面磷灰石诱导能力与药物上载及释放[J]. 中国科技论文, 2014, 9(2): 183-186.
FENG Wei, WEI Da-qing, WANG Huai-hao, et al. Apatite Formation and Drug Release Ability of Nanostructure Modified Bioactive TiO_2 Based Microarc Oxidation Coatings[J]. China Sciencepaper, 2014, 9(2): 183-186.

[14] BAI Long, LIU Yan-lian, DU Zhi-bin, et al. Differential Effect of Hydroxyapatite Nano-Particle Versus Nano-Rod Decorated Titanium Micro-Surface on Osseointegration[J]. Acta Biomaterialia, 2018, 76: 344-358.

[15] ZHANG Lei, LI Bao-e, ZHANG Xian-lin, et al. Biological and Antibacterial Properties of TiO_2 Coatings Containing Ca/P/Ag by One-Step and Two-Step Methods[J]. Biomedical Microdevices, 2020, 22(2): 24.

[16] WANG Xiao-jun, MEI Li-na, JIANG Xue-sheng, et al. Hydroxyapatite-Coated Titanium by Micro-Arc Oxidation and Steam-Hydrothermal Treatment Promotes Osseointegration[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 625877.

[17] LI Ya-da, WANG Wei-qiang, YU Feng-yun, et al. Characterization and Cytocompatibility of Hierarchical Porous TiO_2 Coatings Incorporated with Calcium and Strontium by One-Step Micro-Arc Oxidation[J]. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications, 2020, 109: 110610.

[18] BARATI DARBAND G, ALIOFKHAZRAEI M, HAMGHALAM P, et al. Plasma Electrolytic Oxidation of Magnesium and Its Alloys: Mechanism, Properties and Applications[J]. Journal of Magnesium and Alloys, 2017, 5(1): 74-132.

[19] CLYNE T W, TROUGHTON S C. A Review of Recent Work on Discharge Characteristics during Plasma Electrolytic Oxidation of Various Metals[J]. International Materials Reviews, 2019, 64(3): 127-162.

[20] SANKARA NARAYANAN T S N, PARK I S, LEE M H. Strategies to Improve the Corrosion Resistance of Microarc Oxidation (MAO) Coated Magnesium Alloys for Degradable Implants: Prospects and Challenges[J]. Progress in Materials Science, 2014, 60: 1-71.

[21] GITTENS R A, OLIVARES-NAVARRETE R, SCHWARTZ Z, et al. Implant Osseointegration and the Role of Microroughness and Nanostructures: Lessons for Spine Implants[J]. Acta Biomaterialia, 2014, 10(8): 3363-3371.

[22] HAÏAT G, WANG H L, BRUNSKI J. Effects of Biomechanical Properties of the Bone-Implant Interface on Dental Implant Stability: From in Silico Approaches to the Patient's Mouth[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2014, 16: 187-213.

[23] RAINES A L, OLIVARES-NAVARRETE R, WIELAND M, et al. Regulation of Angiogenesis during Osseointegration by Titanium Surface Microstructure and Energy[J]. Biomaterials, 2010, 31(18): 4909-4917.

[24] GITTENS R A, MCLACHLAN T, OLIVARES-NAVARRETE R, et al. The Effects of Combined Micron-/Submicron-Scale Surface Roughness and Nanoscale Features on Cell Proliferation and Differentiation[J]. Biomaterials, 2011, 32(13): 3395-3403.

[25] LI Ya-da, WANG Wei-qiang, LIU Hui-ying, et al. Formation and in Vitro/in Vivo Performance of "Cortex-Like" Micro/Nano-Structured TiO_2 Coatings on Titanium by Micro-Arc Oxidation[J]. Materials Science and Engineering: C, 2018, 87: 90-103.

[26] CHENG Ying-liang, ZHANG Qing-he, ZHU Zhun-da, et al. Potential and Morphological Transitions during Bipolar Plasma Electrolytic Oxidation of Tantalum in

Silicate Electrolyte[J]. Ceramics International, 2020, 46(9): 13385-13396.

[27] WANG Cui-cui, WANG Feng, HAN Yong. Structural Characteristics and Outward–Inward Growth Behavior of Tantalum Oxide Coatings on Tantalum by Micro-Arc Oxidation[J]. Surface and Coatings Technology, 2013, 214: 110-116.

[28] 李振宗, 薛亚轲, 高华. 微弧氧化和碱处理技术在多孔钽修复兔颅骨缺损中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(3): 316-322.
LI Zhen-zong, XUE Ya-ke, GAO Hua. Application of Micro-Arc Oxidation and Na OH Treatment in the Repair of Rabbit Skull Defect Using Bioactive Tantalum Metal[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2019, 27(3): 316-322.

[29] HU Wei, XU Jiang, LU Xiao-lin, et al. Corrosion and Wear Behaviours of a Reactive-Sputter-Deposited Ta_2O_5 Nanoceramic Coating[J]. Applied Surface Science, 2016, 368: 177-190.

[30] 周泉, 丁泽良, 王易, 等. Ti_6Al_4V 钛合金表面 Ta_2O_5/Ta_2O_5-Ti/Ti 多涂层的制备与性能研究[J]. 包装学报, 2019, 11(6): 23-30.
ZHOU Quan, DING Ze-liang, WANG Yi, et al. Preparation and Properties of Ta_2O_5/Ta_2O_5-Ti/Ti Multi-Coating on Titanium Alloy Ti6Al4V[J]. Packaging Journal, 2019, 11(6): 23-30.

[31] KOHLI S, MCCURDY P R, RITHNER C D, et al. X-Ray Characterization of Oriented B-Tantalum Films[J]. Thin Solid Films, 2004, 469-470: 404-409.

[32] PIERSON J F, CHAPUSOT V, BILLARD A, et al. Characterisation of Reactively Sputtered Ti–B–N and Ti–B–O Coatings[J]. Surface and Coatings Technology, 2002, 151-152: 526-530.

[33] WANG Wei-qiang, ZHENG Xing-chuan, YU Feng-yun, et al. Formation and Cytocompatibility of a Hierarchical Porous Coating on Ti-20Zr-10Nb-4Ta Alloy by Micro-Arc Oxidation[J]. Surface and Coatings Technology, 2020, 404: 126471.

[34] LI Xue-zhong, HUANG Qian-li, ELKHOOLY T A, et al. Effects of Titanium Surface Roughness on the Mediation of Osteogenesis via Modulating the Immune Response of Macrophages[J]. Biomedical Materials (Bristol, England), 2018, 13(4): 045013.

[35] LI Huang-di, HUANG Jing-hui, WANG Yan-peng, et al. Nanoscale Modification of Titanium Implants Improves Behaviors of Bone Mesenchymal Stem Cells and Osteogenesis *In Vivo*[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022, 2022: 2235335.

[36] KOPF B S, RUCH S, BERNER S, et al. The Role of Nanostructures and Hydrophilicity in Osseointegration: In-Vitro Protein-Adsorption and Blood-Interaction Studies[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015, 103(8): 2661-2672.

[37] CUTIONGCO M F A, ANDERSON D E J, HINDS M T, et al. *In Vitro* and *ex Vivo* Hemocompatibility of Off-the-Shelf Modified Poly(vinyl alcohol) Vascular Grafts[J]. Acta Biomaterialia, 2015, 25: 97-108.

[38] RUPP F, SCHEIDELER L, OLSHANSKA N, et al. Enhancing Surface Free Energy and Hydrophilicity through Chemical Modification of Microstructured Titanium Implant Surfaces[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006, 76(2): 323-334.

[39] FIEDLER J, ÖZDEMIR B, BARTHOLOMÄ J, et al. The Effect of Substrate Surface Nanotopography on the Behavior of Multipotnent Mesenchymal Stromal Cells and Osteoblasts[J]. Biomaterials, 2013, 34(35): 8851-8859.

[40] YUAN Xiang-wei, OUYANG Li-ping, LUO Yao, et al. Multifunctional Sulfonated Polyetheretherketone Coating with Beta-Defensin-14 for Yielding Durable and Broad-Spectrum Antibacterial Activity and Osseointegration[J]. Acta Biomaterialia, 2019, 86: 323-337.

[41] BOYAN B D, BONEWALD L F, PASCHALIS E P, et al. Osteoblast-Mediated Mineral Deposition in Culture is Dependent on Surface Microtopography[J]. Calcified Tissue International, 2002, 71(6): 519-529.

责任编辑：刘世忠

（上接第 353 页）

[23] MAHATA S, SHAKYA P, BABU N R, et al. In-Process Characterization of Surface Finish in Cylindrical Grinding Process Using Vibration and Power Signals[J]. Procedia CIRP, 2020, 88: 335-340.

[24] JAMSHIDI H, BUDAK E. An Analytical Grinding Force Model Based on Individual Grit Interaction[J]. Journal of Materials Processing Technology, 2020, 283: 116700.

[25] CAI Si-jie, YAO Bin, ZHENG Qing, et al. Dynamic Grinding Force Model for Carbide Insert Peripheral Grinding Based on Grain Element Method[J]. Journal of Manufacturing Processes, 2020, 58: 1200-1210.

[26] AZARHOUSHANG B, KITZIG-FRANK H. Principles of Grinding Processes[M]// Tribology and Fundamentals of Abrasive Machining Processes. Amsterdam: Elsevier, 2022: 351-468.

责任编辑：彭颋