doi:10.3772/j.issn.1002-0470.2022.08.010

# 钛合金磨粒流加工表面细胞黏附研究<sup>①</sup>

张利② 应荣敏 陈国达 黄 一 单晓杭③

(浙江工业大学机械工程学院 杭州 310032)

摘 要 采用磨粒流冲蚀方法加工钛合金薄片表面,所用磨粒粒径为8~18 μm,得到具 有不同表面粗糙度 Ra 值的钛合金薄片表面,在此基础上进行小鼠成骨细胞(MC3T3-E1) 体外黏附实验,探究不同粗糙度 Ra 值对薄片表面细胞黏附性能的影响。实验结果表明,磨 粒流加工处理后,钛合金薄片表面均匀性好,得到的表面粗糙度 Ra 范围为0.05~0.15 μm, 且发现钛合金对成骨细胞的黏附存在抑制作用,实验范围内 Ra 为0.08~0.10 μm 的薄 片黏附率最高,其黏附效果最好。上述研究结果为磨粒流加工技术及钛合金表面生物相 容性的后续研究奠定了基础。

关键词 细胞黏附;表面粗糙度;钛合金;磨粒流加工

0 引言

随着年龄增长,骨组织极易损伤且力学性能退 化<sup>[1]</sup>。对于55岁以上的人群,骨关节病发病率达到 了80%,严重会导致关节活动能力丧失,生活不能 自理。目前,使用医用材料进行损伤关节替换的人 工关节置换术是治愈关节疾患终末期的最有效手 段。钛合金具有良好的力学性能与生物相容性,是 现有医用内植入产品的首选材料<sup>[23]</sup>,但钛合金表 面硬度较高、工艺性较差,使其复杂曲面的表面加工 困难,存在加工均匀性差、效率低的问题。

关节置换术实施后,医用材料与活体组织是直 接接触的,因此材料的生物相容性、毒性、耐用性尤 为重要,即需确保人工关节使用中对人体是安全 的<sup>[4]</sup>。细胞黏附即细胞附着于植入体的过程,是植 入体进入人体后所有生物学行为的第一步,有了良 好的黏附基础,细胞随后的增殖、分化、迁移和凋亡 才能正常进行<sup>[5]</sup>。细胞与底物之间的黏附过程为 底物吸附细胞外介质中的离子和水,继而吸附其中 的黏附类蛋白,形成蛋白聚集层后,细胞通过离子 键、范德华力等弱作用力附着在材料表面。植入体 的化学组成,决定了材料的亲疏水性,植入体表面形 貌的变化又会使其具有不同表面力场、表面电荷及 表面能<sup>[56]</sup>。过于粗糙的植入体表面会引起血凝, 磨损会产生微小颗粒<sup>[7]</sup>,而过于光滑的表面,与组 织接触易形成炎症。目前生物材料粗糙度研究范围 为10 nm~10 μm,该尺寸对细胞与生物材料表面的 相互作用影响较大。

本文基于仿型流道磨粒流技术加工4组 Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V 钛合金薄片表面,并进行体外细胞黏附对比 实验,观察磨粒流加工后薄片表面的微观形貌特征, 探索适宜 MC3T3-E1 细胞黏附的表面粗糙度,对于 钛合金人工关节表面处理及其生物相容性的相关研 究具有重要意义。

# 1 材料与方法

## 1.1 钛合金薄片处理及检验

1.1.1 加工方法

仿型流道磨粒流表面加工技术原理图如图1所

① 国家自然科学基金(51575493)和浙江省基础公益研究计划(LGG19E050025)资助项目。

② 女,1971年生,博士,教授;研究方向:超精密加工技术,机电控制及自动化技术;E-mail: zhangli@ zjut. edu. cn。

③ 通信作者, E-mail: sxh@ zjut. edu. cn。 (收稿日期:2021-02-14)

示<sup>[8]</sup>,利用仿型约束构件与钛合金工件表面共同组 成一条厚度均匀的加工约束流道,在泥浆泵的作用 下磨粒(SiC)体积分数在0.1~0.3之间的软性磨粒 流从流道入射口流入<sup>[9-10]</sup>,根据流动特性流体进入 约束流道后发展为湍流状态并填充满整个流道<sup>[11]</sup>。 其中磨粒在液相载体作用下做无规则随机运动并且 不断冲击被加工件表面,实现微量微力的微切削作 用,从而实现对关节复杂表面的精密加工。



选用 Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V 的钛合金圆薄片作为实验品,厚 度为1 mm,直径为10 mm。将钛合金分为4组,每 组20片,表面粗加工使用砂纸抛光至粗糙度 Ra 约 为0.23 μm,精加工分别采用磨粒粒径为8 μm、 10 μm、13 μm 和18 μm,体积分数为0.1 的软性磨 粒流进行加工,加工时长5 h。

1.1.2 表面形貌观察及粗糙度测量

采用 KEYENCE VW-60 动态分析三维显示系统,对钛合金抛光前及不同粒径磨粒流抛光后的表面形貌进行观察。

采用 Mitutoyo 粗糙度仪测量钛合金片的表面粗糙度 Ra。测量方法是在各个钛合金片上取5个点进

行测量,结果取其平均值。

1.2 细胞黏附实验与检测

1.2.1 材料

主要仪器:二氧化碳培养箱(Thermo,美国)、倒 置显微镜(Olympus,日本)、酶标仪(华东电子,中 国)、低速台式离心机(Anke,中国)。

主要试剂:0.25% 胰蛋白酶溶液、DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)培养液、胎牛血清,二甲基亚砜(DMSO),磷酸盐缓冲液(PBS),5 mg/ml噻唑蓝(MTT)溶液。

细胞:MC3T3-E1 小鼠成骨细胞,由国家实验细胞共享服务平台提供。

1.2.2 细胞复苏与传代

无菌条件下将 MC3T3-E1 细胞从 - 80 ℃ 低温 环境取出,置于 37 ℃的水浴中复温,不断摇动,完全 融化后,取 1 ml 冻存悬液至离心管,1000 r/min 离心 5 min,吸除上清液,完成复苏。

复苏后加入培养基(DMEM + 10% 胎牛血清), 移至 25T 培养瓶中,放入 37 ℃、5% 的二氧化碳培养 箱进行培养,于细胞铺满培养瓶 90% ~ 100% 进行 传代。加入 PBS 缓冲液,洗去未黏着细胞,重复 2 ~ 3 次,吸除 PBS 溶液,加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液 进行消化,使用倒置显微镜对消化情况进行观察,细 胞回缩变圆后,加入适量的培养基停止消化,制成细 胞悬液。按 1:2 进行传代培养。中间每 2 d 更换一 次培养基,每次传代重复以上操作,直至第 4 代,如 图 2 所示,细胞密度增加且伸展状况良好,用于后续 实验。



图 2 第四代细胞培养情况

1.2.3 实验分组

对照组1中未放置钛合金片,直接在24孔板内 876 — 接种细胞;对照组2中既未放置钛合金也未接种细胞。实验组将钛合金薄片使用75%酒精进行清洗,

— 876 —

高压蒸汽消毒晾干后,按精加工磨粒流磨粒粒径 值的不同各取 10 片,设置为实验组 1 (8 μm)、 实验组 2(10 μm)、实验组 3 (13 μm)和实验组 4 (18 μm),每片1 个孔。

1.2.4 细胞黏附

将细胞悬液加入培养液稀释至 5 ml,血球计数 板测得悬液密度 8.4×10<sup>5</sup> 个/ml,取 100 μl 悬液接 种于 24 孔板中的样品表面上(图 3),细胞悬液能够 借助液体自身的张力完全覆盖于钛合金片表面之 上,置于细胞培养箱中培养。培养 24 h 后,吸掉孔 板中培养液,用 PBS 洗去未黏附细胞,加入 DMEM 溶液与 MTT 溶液,再培养 4 h 后取出,吸除培养液, 加入 DMSO 溶液,于振荡器振荡至结晶完全溶解。 每组各取部分溶液移至 96 孔板,放入酶标仪中测量 光吸收值(OD),并取平均。



图 3 钛合金接种细胞悬浮液

MTT 比色法原理:对于外源性的 MTT 溶液,活 细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将其还原为一种蓝 紫色的甲瓒晶体。该晶体不溶于水,并且在细胞中

沉积,而已经死亡的细胞无法完成该功能,故测定在 490 nm 波长的条件下各组的光吸收值,吸光度越 大,证明该组活细胞数目越多,反之亦然。

#### 1.2.5 统计学分析

使用统计学软件 SPSS 13.0 对细胞黏附实验得 到的各组吸光度进行分析,由于从成骨细胞黏附实 验获得的是重复测量数据,因此使用完全随机设计 的单向方差分析方法。检验水准 α = 0.05, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

1.2.6 黏附百分比

为了进一步表现各实验组以及对照组之间成骨 细胞黏附效果的差异,使用细胞黏附百分比进行对 比分析,如下式<sup>[12]</sup>所示。

$$P_{ad} = \frac{OD_i}{OD_{\text{xt} \text{IR}1} - OD_{\text{xt} \text{IR}2}} \times 100\%$$

式中, $P_{ad}$ 为细胞黏附百分比, $OD_i$ 为第*i*组实验的平均吸光度, $OD_{\text{xH}}$ 为对照组1的MTT实验吸光度平均值, $OD_{\text{xH}}$ 为对照组2的MTT实验吸光度平均值。

## 2 结果

### 2.1 钛合金表面粗糙度

使用 8 µm 粒径磨粒流加工后薄片粗糙度 Ra 平均值与方差结果如表 1 所示,由表可知,表面粗糙 度 Ra 平均值范围为 0.05 ~ 0.08 µm。同理,测量计 算后得到 10 µm 粒径的磨粒流加工得到钛合金 片表面粗糙度Ra平均值范围为0.08 ~ 0.10 µm,

表1 8 µm 粒径磨粒流加工后薄片表面粗糙度 Ra

磨粒粒径					8 k	ım				
平均值/μm	0.052	0.056	0.057	0.061	0.063	0.066	0.070	0.073	0.075	0.077
方差	$2.6 \times 10^{-5}$	$4.7 \times 10^{-5}$	$5.7 \times 10^{-5}$	$4.0 \times 10^{-5}$	$5.2 \times 10^{-5}$	$7.9 \times 10^{-5}$	6.1 × 10 <sup>-5</sup>	$4.5 \times 10^{-5}$	$5.3 \times 10^{-5}$	$3.2 \times 10^{-5}$

13 μm粒径的磨粒流加工得到钛合金片表面粗糙度 Ra 平均值范围为 0.10~0.12 μm,18 μm 粒径的磨 粒流加工得到钛合金片表面粗糙度 Ra 平均值范围 为 0.12~0.15 μm。结果如表 2 所示。

-						
	磨粒粒径/μm	加工后粗糙度 Ra 平均值范围/µm				
	8	0.05 ~ 0.08				
	10	0.08 ~0.10				
	13	0.10~0.12				
	18	0.12~0.15				
_						

#### 2.2 钛合金表面形貌

不同磨粒粒径磨粒流加工钛合金表面形貌观察 结果如图4所示。图4(a)为钛合金片经砂纸粗加 工后的表面,密集分布有条纹状沟槽及凹坑,且沟槽 的宽度与深度大小不一,整体表面精度低。图4(b) ~(e)为进一步经过磨粒流精加工的钛合金薄片表面图,由图可见表面的沟槽结构已冲蚀消失,仅剩部分凹坑与挤出唇离散分布,且磨粒粒径越小,凹坑与挤出唇尺寸越小、数量越少。





图 4 不同磨粒粒径磨粒流加工钛合金表面形貌

## 2.3 吸光度检测结果

用酶标仪检测各组黏附结果,并取平均值,实验 组1~4吸光度分别为0.098、0.127、0.122、0.118, 对照组1吸光度为0.144,对照组2吸光度为0.006。 由图5可知,吸光度随表面粗糙度的增加呈现先增 加再减小的趋势。



图 5 各实验组吸光度与粗糙度对比图

统计学分析:实验组2、实验组3和实验组4三 组吸光度两两之间无显著差异(P>0.05),而对比 实验组1,吸光度明显更高(P<0.05)。另外,相较 于各个实验组,对照组1吸光度更高(P<0.05)。

## 2.4 黏附比分析

图6为各实验组的细胞黏附百分比柱状图,从



中得出黏附百分比最低的是实验组 1,只有 71.01%;实验组 3 的细胞黏附百分比为 88.41%, 实验组 4 为 85.51%,两者实验结果相近;实验组 2 的细胞黏附百分比达到了 92.02%,黏附率最高。

# 3 讨论

钛合金具备韧性好、强度高、密度低[13-14]等优 良性质,其表面自然生成的 TiO, 氧化涂层能控制基 体离子溶出,增强其抗腐蚀性与生物相容性。传统 的抛光方式如车削、磨削,耗时长<sup>[15]</sup>,并在材料表面 形成一定规则的沟槽分布,且难以保证表面粗糙度 的整体均匀性。本研究采用软性磨粒流约束流道的 方法,利用磨粒在约束流道内的湍流壁面效应实现 抛光加工,所用磨粒粒径范围为8~18 µm,加工得 到的钛合金薄片表面粗糙度 Ra 整体范围在 0.05~ 0.15 μm 之间,使用磨粒粒径越小,加工所得表面粗 糙度 Ra 值越小。从图 4 中观察可得,加工后的钛 合金表面形貌未呈现出规律性,这是软性磨粒流加 工无序性特征的结果,可能会对细胞在其表面的黏 附、铺展起到较好的接触引导效果,同时表面的微坑 与挤出唇增大了材料的表面积,可为细胞提供更多 的黏附区域。

医用材料表面性质的变化对生物相容性的影响 是人工关节领域的研究热点,表面性质中产生影响 作用最大的就是微观几何和表面粗糙度<sup>[7]</sup>。已有 研究表明,细胞中存在细胞黏附分子——整联蛋白, 细胞外环境可通过其调控细胞内活性,蛋白的胞外 结构域与其特异性的配体相互作用,可产生多种信 号,对细胞黏附、生长、迁移等行为产生影响[16]。本 研究采用体外实验的方法,观察在磨粒流处理后不 同粗糙度 Ra 的钛合金薄片表面上 MC3T3-E1 细胞 的黏附差异。研究发现 Ra 于 0.05~0.08 μm 内的 薄片表面细胞黏附效果最差,说明过于光滑的表面, 附着点少,不利于细胞黏附。对照组1中,成骨细胞 直接黏附于24孔板的内壁上,吸光值明显高于钛合 金实验组,说明钛合金薄片对成骨细胞的黏附存在 抑制作用。此外,实验组2薄片黏附率最高,为92%, 因此认为磨粒流加工后得到 Ra 为 0.08~0.10 µm 的表面最有利于细胞黏附,而较粗糙和较光滑的表面均会在一定程度上影响成骨细胞的黏附效果。

目前,众多学者就表面粗糙度对细胞黏附的影 响进行了研究。Deligianni等人<sup>[17]</sup>利用3种规格粗 碳化硅砂纸处理钛合金表面,发现 *Ra*为0.3 μm 表 面细胞黏附量最少,粗糙度越高对细胞黏附行为越 有利,与本研究结果差别较大。Huang等人<sup>[18]</sup>利用 抛光粉及砂纸处理出粗糙度 *Ra*在50 nm~1.2 μm 的5种钛金属表面,结果显示金属表面的沟槽对细 胞黏附有接触引导现象,且相对于较粗糙或较光滑 的样品,*Ra*为150 nm 的表面表现出了最佳的细胞 黏附性能,与本研究结果较为一致。

细胞黏附的影响因素众多,即使表面粗糙度 Ra 相同,材料不同或加工方法不同都会导致细胞反应 的差异<sup>[19]</sup>,因此,为探索不同加工方法的细胞黏附 差异性,需就各自处理得到的最佳黏附表面的黏 附效果进行对比分析。赵昕<sup>[20]</sup>对 Ra 为 0.3 μm ~ 1.8 μm的砂纸抛光后钛合金表面对 MC3T3-E1 细胞 黏附的影响机制进行了分析,发现粗糙度 Ra 介于 0.9~1.0 μm 之间的表面得到了 80% 的最佳黏附 率,相较之下,磨粒流加工后的最佳黏附率达到了 92%,说明磨粒流技术加工出的表面形貌比砂纸抛 光更适宜于 MC3T3-E1 细胞黏附。

## 4 结论

本研究探索了磨粒流加工得到的 Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V 钛合 金表面的微观形貌及表面粗糙度 Ra 对 MC3T3-E1 细胞黏附的影响,得到如下结论。

(1)通过观察磨粒流加工后的钛合金薄片表面 形貌,发现其表面离散分布有微坑与挤出唇,均匀性 较好,证实了磨粒流加工的优异性。

(2)通过对比对照组1与钛合金实验组,发现 实验组吸光值低,说明放置了钛合金后,反而对细胞 的黏附起到了抑制作用。

(3)通过各个实验组之间的吸光值对比分析可得,粗糙度 Ra 为0.05~0.08 μm 实验组1 吸光值显 著低于其他组,说明过于光滑的表面并不利于细胞 黏附。 (4) 从黏附率的计算结果来看,实验组2 黏附 率最高,达到了92%,说明磨粒流处理后的钛合金 表面最适宜细胞黏附的粗糙度 *Ra* 阈值为0.08 ~ 0.10 μm,这一结果为磨粒流加工技术及钛合金表 面生物相容性的进一步研究提供了参考。

#### 参考文献

- [1]周廉.中国生物医用材料科学与产业现状及发展战略 研究[M].北京:化学工业出版社,2012:4-10
- [2] LIU X, ZHU L, LIU H, et al. Investigation of MAO coating growth mechanism on aluminum alloy by two-step oxidation method[J]. Applied Surface Science, 2014, 293 (8): 12-17
- [ 3] KASALICA B, RADIC P J, PERIC M, et al. The mechanism of evolution of micro discharges at the beginning of the PEO process on aluminum[J]. Surface and Coatings Technology, 2016, 298: 24-32
- [4] 贝建中, 屈雪, 王身国. 生物材料与细胞的相互作用 [J].北京生物医学工程, 2005,24(1):64-70
- [5] ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials [J]. Biomaterials, 2000, 24: 4663-4670
- [6] ANSELME K, LINEZ P, BIGERELLE M, et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior [J]. Biomaterials, 2000, 21(15): 1567-1577
- [7] KIM H K, JANG J W, LEE C H. Surface modification of implant materials and its effect on attachment and proliferation of bone cells[J]. *Journal of Materials Science*: *Materials in Medicine*, 2004, 15: 825-830
- [8] 张利,黄一,陈国达,等. 钛合金曲面磨粒流加工扰流 流道仿真与试验研究[J]. 中国机械工程,2019,30 (5):519-527
- [9] 计时鸣,周龙兵,谭大鹏. 软性磨粒流精密加工工艺参

数优化方法[J]. 中国机械工程, 2013, 24(14): 1943-1950

- [10] 计时鸣,付有志,谭大鹏. 软性磨粒流双入口约束流场数值分析及加工试验研究[J]. 机械工程学报, 2012, 48(19):177-185
- [11] 袁巧玲,计时鸣,文东辉,等.基于改进的低雷诺数湍 流模型的软性磨粒流加工仿真与实验[J].中国机械 工程,2014,25(6):800-807
- [12] REILLY G C, ENGLER A J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation [J]. Journal of Biomechanics, 2010, 43(1): 55-62
- [13] 张文毓. 生物医用钛合金的研究进展[J]. 化学与黏合, 2016, 36(5): 369-373
- [14] 闫玉华,段湘慧.人工关节的研究现状和发展趋势 [J].生物骨科材料与临床研究,2004,1(4):39-43
- [15] 袁巨龙,张飞虎,戴一帆,等. 超精密加工领域科学 技术发展研究[J]. 机械工程学报,2010,46(15): 161-177
- [16] 张惠静,杨力,蔡绍皙,等.周期性机械拉伸对人肺 上皮细胞增殖的影响[J].高技术通讯,2003,13 (8):51-55
- [17] DELIGIANNI D, KATSALA N, LADA S, et al. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V onhumanbone marrow cell response and on protein adsorption
   [J]. Biomaterials, 2001, 22(11): 1241-1251
- [18] HUANG H H, HO C T, LEE T H, et al. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion
  [J]. Biomolecular Engineering, 2004, 21(3-5): 93-97
- [19] 梁迎春,宋代平,陈明君,等. 钛系生物医用材料表面 粗糙度影响细胞黏附的新进展[J]. 机械工程学报, 2008,44(7):6-15
- [20] 赵昕. Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V 生物材料表面粗糙度对成骨细胞黏附 的影响机制研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学机电 工程学院, 2010: 42-50

# Research of surface cell adhesion on titanium alloy by abrasive flow machining

ZHANG Li, YING Rongmin, CHEN Guoda, HUANG Yi, SHAN Xiaohang

(College of Mechanical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)

#### Abstract

The abrasive flow erosion method with abrasive particle size of  $8 - 18 \ \mu m$  is used to treat the surface of the titanium alloy sheet. The surface roughness with different Ra values is obtained. To explore the effects of different surface roughness Ra on the adhesion properties of cells on the sheet surface, the mouse osteoblasts (MC3T3-E1) adhesion experiments are conducted on the obtained sheets. The results show that after the abrasive flow processing, the surface uniformity of the titanium alloy sheet is good, and the surface roughness Ra is in the range of  $0.05 - 0.15 \ \mu m$ . Moreover, it is found that titanium alloy is not conducive to cell adhesion. Within experimental range, the titanium alloy sheets with surface roughness Ra ranges of  $0.08 - 0.10 \ \mu m$  have the highest adhesion rate, which means it provides a better condition for the osteoblasts to adhere to. These results lay a foundation for further research on abrasive flow processing technology and the surface biocompatibility of titanium alloys.

Key words: cell adhesion, surface roughness, titanium alloy, abrasive flow machining

— 880 —