

皮秒激光对医用钛合金植入物表面 微加工及生物相容性的研究

虞宙¹, 张文杰², 胡俊¹

¹上海交通大学机械与动力工程学院, 上海 200240;

²上海交通大学附属第九人民医院口腔颌面外科, 上海 200011

摘要 钛合金具有优良的综合性能,作为医用金属植入材料广泛应用于临床医学,而在钛合金植入物表面进行微造型有助于提高钛合金的生物相容性。采用 1064 nm 波长的皮秒激光在钛合金(Ti-6Al-4V)表面进行微造型实验,并验证微造型的生物相容性。设计正交实验,通过扫描电子显微镜、扫描探针显微镜和共聚焦显微镜分析了样件表面形貌,建立微造型几何尺寸与激光参数的关系,确立了最优工艺参数,完成钛合金微造型样件制备。进行了大鼠骨髓间充质干细胞培养和免疫荧光观察细胞骨架实验。实验表明,微造型对细胞生长起到促进和引导作用。

关键词 激光制造;皮秒激光;表面微造型;钛合金植入物;生物相容性

中图分类号 TN249

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201744.0102014

Micromachining of Titanium Alloy Implant by Picosecond Laser Surface Texturing and Alloy Biocompatibility

Yu Zhou¹, Zhang Wenjie², Hu Jun¹

¹School of Mechanical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China

Abstract Titanium alloy has excellent comprehensive properties, and it is widely used in clinical applications. Studies show that it is helpful to improve the biocompatibility of titanium alloy implant by introducing specific textures to the surface. A pulsed picosecond laser emitting at 1064 nm was used to process titanium alloy (Ti-6Al-4V), and the biocompatibility of laser textures was verified. Orthogonal experiments were designed, and the surface morphology of the samples was analyzed by using scanning electron microscope, scanning probe microscope and confocal microscope. The relationship between surface morphology of titanium alloy and picosecond laser processing parameters was investigated in order to determine the optimal process parameters. Meanwhile, cell culture and actin cytoskeleton staining were conducted. The experiments show that the picosecond laser surface texturing plays a role in promoting and guiding growth of cells.

Key words laser manufacturing; picosecond laser; surface texture; titanium alloy implants; biocompatibility

OCIS codes 140.3390; 320.5390; 160.1435; 170.1530

1 引言

由于钛合金具有优异的机械性能和生物相容性,所以被广泛地用于生物医学领域,例如植入式电子设备,义齿和骨内种植体等^[1-3]。种植体表面微造型可以为细胞粘附提供信号并增加细胞伪足攀附的接触面

收稿日期: 2016-08-15; 收到修改稿日期: 2016-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(51575352)

作者简介: 虞宙(1990—),男,博士研究生,主要从事激光精细加工方面的研究。E-mail: yz_sjtu@hotmail.com

导师简介: 胡俊(1975—),男,博士,副教授,主要从事激光精细加工、数控技术与装备方面的研究。

E-mail: hujun@sjtu.edu.cn(通信联系人)

积,所以种植体界面的微结构会对其生物学特性产生影响。在过去的研究中,各种表面微造型技术,包括喷砂^[4]、化学腐蚀^[5]、等离子喷涂^[6]、电化学加工^[7]、激光加工^[8-9]以及多种方法的组合被开发运用,并被证明是提高植入物生物相容性的有效手段。化学或传统的物理方法难以在一个特定的位置形成可控的特殊形状,此外存在效率低、成本高、处理困难等缺点,而激光加工技术可以形成更为复杂和可控的微造型形貌且污染少^[9]。目前长脉冲激光装置的表面微造型方法已经被广泛报道^[10-11]。近年来,随着短脉冲激光的发展,由于其具有较高的精度,较小的热影响区和更高的加工质量,短脉冲激光的表面微造型方法已成为一种更为先进的技术^[12-13]。

不同于长脉冲激光有着充足的时间热扩散到靶材料,超短脉冲激光与物质作用时,在短时间内完成激光能量的传递。这导致材料辐照区域温度迅速升高,能量来不及扩散,仅在材料表面很薄的一层上达到很高的温度。超短脉冲激光极短的脉冲持续时间使得在激光与物质相互作用期间基本上不需要考虑流体动力学过程的影响,激光能量直接沉积在材料的趋肤层内,极大地降低了材料的烧蚀阈值,也使得因热传导作用而影响的热效应体积明显减少^[14]。现在超短脉冲激光微加工已成为激光精密加工领域的前沿,如利用飞秒激光诱导透明材料局部折射率变化的现象,在样品内部制备光波导、分束器、耦合器等各种光子器件;通过激光干涉或者相位掩模技术在光纤中制备光纤布拉格光栅结构;利用超短脉冲激光微加工技术在材料的表面或体内实现微米甚至亚微米精度的钻孔、开槽等精细加工^[15]。

本文研究了皮秒激光功率和扫描参数对于钛合金微造型形貌的影响,建立了微造型几何尺寸与激光参数的关联,确立了最优加工参数并以此制备生物相容性实验样件,通过细胞培养和细胞骨架观测实验,验证了微沟槽造型形貌与生物相容性的关联。

2 实 验

2.1 皮秒激光参数研究

实验采用了Edgewave公司PX200-3-GH皮秒激光器,波长为1064 nm,脉宽为10 ps,重复频率范围为400~1000 kHz,激光束采用焦距100 mm的凸透镜聚焦,光斑半径约15 μm 。表面微造型样件为尺寸10 mm \times 10 mm \times 1 mm的TC4(Ti-6Al-4V)钛合金片,样品的表面成分如表1所示。钛合金片依次经过600,800,1200目(23,18,12.4 μm)的砂纸打磨,并用0.5 mol/L的氧化铝悬浮液进一步抛光,最后在水乙醇中超声清洗并干燥。实验中,水平偏振的高斯光束聚焦到工作台上的钛合金片,并通过改变激光功率 P 、扫描次数 N 、扫描速度 V 以及重复频率 f ,制备不同的微沟槽样件。

表1 TC4表面元素组成

Table 1 Elemental analysis of TC4 surface

Component	Al	V	Ti	Other
Mass fraction /%	5.5-6.8	3.4-4.5	88.1-91.1	Residual

2.2 表面特征分析

2.2.1 扫描电子显微镜(SEM)

样件的表面形貌由高分辨率场发射扫描电子显微镜(JEOL JSM-7800F Prime,日本电子株式会社,日本)表征。为了观测样件的整体形貌、加工质量以及局部微结构特征,微造型样件经过丙酮超声清洗5 min后,由扫描电子显微镜观测成像。

2.2.2 扫描探针显微镜(SPM)

采用生物快速型扫描探针显微镜快速扫描50 μm \times 50 μm 的范围,分辨率为0.03 nm。测量数据由样件的三个不同位置得到以确保测量结果的有效性和准确性。

2.3 细胞培养与细胞骨架染色

从4周龄大鼠获得大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC),该细胞在含有体积分数为10%胎牛血清(FBS)和体积分数为1%青链霉素双抗的培养液中培养。使用第三代细胞,浓度为 10^6 mL^{-1} ,在每个样件培养24 h后用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液冲洗3次并用4%多聚甲醛溶液固定,随后用0.1%的曲拉通X-100溶液浸泡30 min。采用Rhodamine-Phalloidin和多色核荧光染料DAPI试剂对肌动蛋白及细胞核染色,并通过

Olympus 数码相机获得图像。

3 实验结果及分析

3.1 皮秒激光加工微沟槽的形貌特征

为了确定皮秒激光加工钛合金的最优加工参数,设计了四因素、三水平的 L_{16} 正交阵列,因素包括激光功率,扫描次数,扫描速度和重复频率。激光加工的评价指标为:1) 加工质量,包括热影响区,在微沟槽内的残渣情况以及微沟槽的整体形貌;2) 微沟槽的具体尺寸,用于在数值上确定微造型样件的可控性和可重复性。

3.1.1 微沟槽的最佳加工参数

图 1 显示了在不同加工参数下的几种微沟槽 SEM 图片,可以得出,不同的工艺参数对于微沟槽的加工质量有着很大的影响。图 1(a)显示一个加工质量较差的微沟槽,沟槽的边缘不连续且有块状的金属熔融残渣分散在沟槽内。图 1(b)加工质量有所改善,仍有很多颗粒状残渣留在沟槽内。图 1(c)有着更高的加工质量,更光滑的底部和锐利的边缘。通过高倍率放大图可以看到,在沟槽内存在周期处于激光波长尺度的微纳米条纹。这是由于入射激光在金属表面激发产生一传播方向与入射光的电矢量偏振方向相同的等离子体波,而入射激光与其在材料表面诱导激发的等离子体波存在能量耦合,两者之间发生干涉,使得样品表面形成亚波长周期性条纹结构(LIPSS)。实验发现,激光功率和扫描速度对沟槽的刻蚀质量有更明显的影响。在激光功率 $P \approx 20$ W,扫描速度 v 为 $1000 \sim 2000$ mm/s,重复频率 $f = 400$ kHz 时微沟槽具有更良好的加工质量。

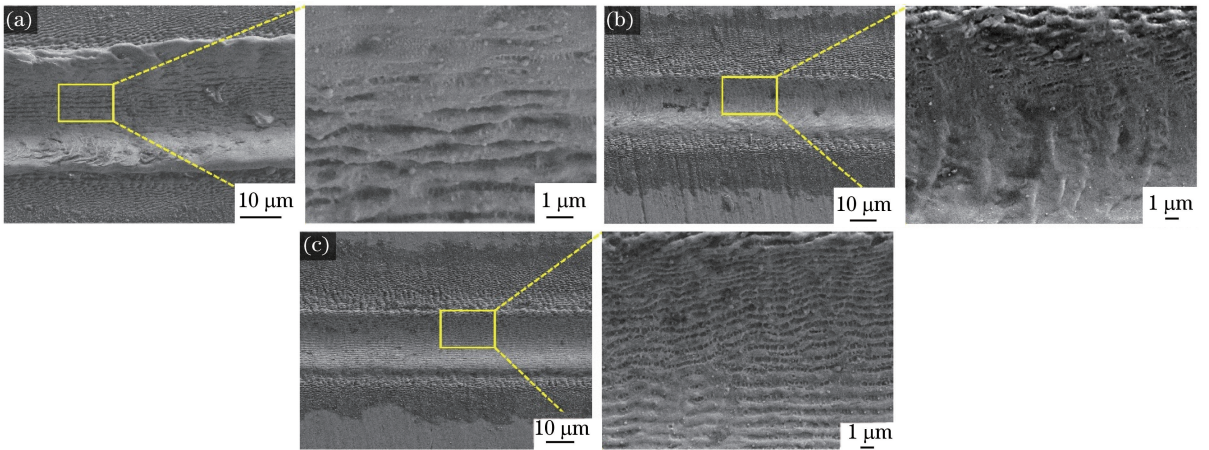


图 1 钛合金样件的 SEM 图像。(a)加工参数 $P = 25$ W, $v = 500$ mm/s, $N = 5$, $f = 400$ kHz; (b)加工参数 $P = 25$ W, $v = 1000$ mm/s, $N = 10$, $f = 1000$ kHz; (c)加工参数 $P = 30$ W, $v = 2000$ mm/s, $N = 10$, $f = 400$ kHz

Fig. 1 SEM images of the titanium alloy surface following picosecond laser treatment. (a) Sample obtained when $P = 25$ W, $v = 500$ mm/s, $N = 5$, $f = 400$ kHz; (b) sample obtained when $P = 25$ W, $v = 1000$ mm/s, $N = 10$, $f = 1000$ kHz; (c) sample obtained when $P = 30$ W, $v = 2000$ mm/s, $N = 10$, $f = 400$ kHz

3.1.2 微沟槽的制备

按照确定的最优加工参数,选择恒定功率 $P = 20$ W,重复频率 $f = 400$ kHz,扫描速度 $v = 1200, 1600, 2000, 2400$ mm/s,扫描次数 $N = 1, 4, 7, 10$ 分别制备样件。采用 SPM 观测微沟槽轮廓并测量具体尺寸。由于受加工表面温度梯度引起的蒸气反冲压力和 Marangoni 效应的影响,钛合金熔融物飞溅到材料表面,在样件截面形成具有火山口形貌的 U 形沟槽,如图 2 所示。对每组参数制备三次重复试样并利用统计分析软件(PASW)统计数据,分析实验参数对微沟槽尺寸相关性的影响。软件采用多元方差分析(Manova)过程来拟合典型相关分析,给出表征实验因素与响应相关性的参数 p 值,以 $p < 0.05$ 为相关性显著, $p < 0.01$ 为非常显著。实验结果表明,扫描速度对沟槽深度有显著影响($p = 0.000$),而对宽度的影响不明显($p = 0.054$)。扫描次数和沟槽深度之间的相关性是显著的($p = 0.004$),但扫描次数与沟槽宽度之间的相关性不大($p = 0.241 \gg 0.05$)。这是由于沟槽宽度在 $25 \sim 30 \mu\text{m}$ 时,尺寸主要由光斑聚焦的大小决定,比起沟槽深度 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ 高出一个数量级,受到激光参数的影响相对更少。

由于微沟槽的深度也是影响细胞生物特性的主要因素,图 3 和图 4 显示了在恒定激光功率 20 W,重复

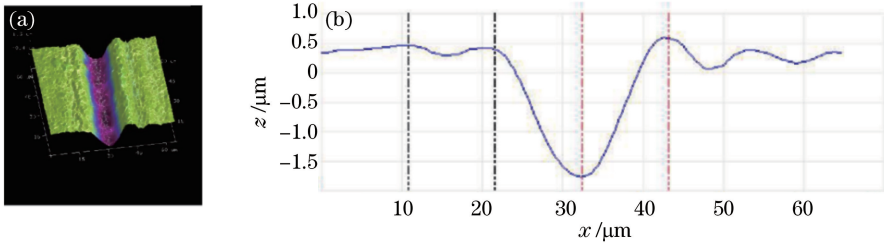


图 2 样件的 SPM 图像。(a) 3D 形貌;(b) 2D 形貌

Fig. 2 SPM images of the titanium alloy surface processed by picosecond laser. (a) 3D morphology of sample surface; (b) 2D profile of the groove

频率为 400 kHz 时微沟槽深度和扫描参数的关系。为了保证实验的可控性和可重复性,所有的参数都进行了三次重复实验,并在每个样件的三个不同位置进行测量。在恒定的扫描次数下,微沟槽的深度会随着扫描速度增加而减小,并且在 1200~1600 mm/s 发生急剧下降;在恒定的扫描速度下,随着扫描次数的增加,微沟槽的深度增加。

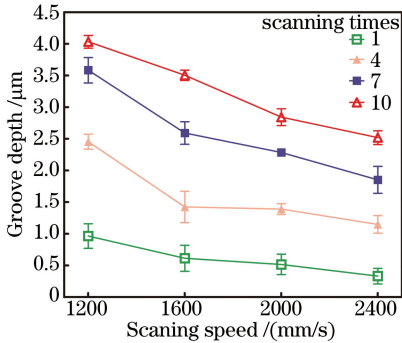


图 3 不同扫描次数下微沟槽深度与扫描速度关系

Fig. 3 Grooves depth versus scanning speed

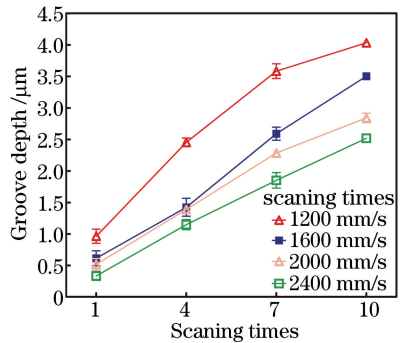


图 4 不同扫描速度下微沟槽深度与扫描次数关系

Fig. 4 Grooves depth versus scanning times

3.2 细胞粘附和形貌分析

根据最优工艺参数制备多道平行微沟槽样件用于生物相容性实验,采用参数实验的结果定量加工深度为 4.0, 2.5, 1.0 μm 的微沟槽造型。其编号及具体尺寸如表 2 所示。样件表面形貌采用 SEM 分析,如图 5 所示。这些微沟槽可以改变样件的表面粗糙度,增加样件与细胞之间的接触面积,并增加样件表面细胞伪足的粘附。

表 2 生物相容性实验样件编号及具体尺寸

Table 2 Serial number and specific size of biocompatibility test samples

Serial number	Spacing / μm	Depth / μm
1	75	4.0
2	150	4.0
3	75	2.5
4	150	2.5
5	75	1.0
6	150	1.0

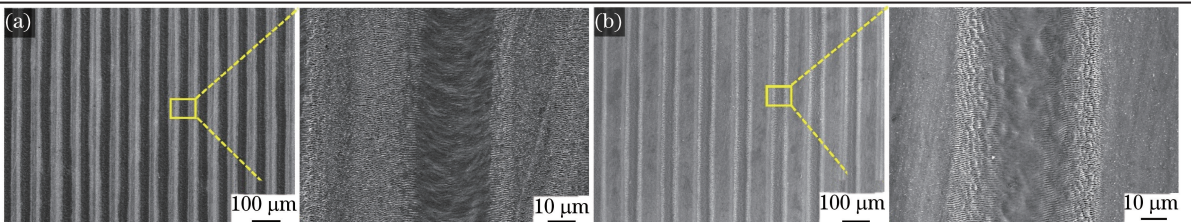


图 5 SEM 分析多道平行微沟槽造型。(a) 沟槽间距 75 μm;(b) 沟槽间距 150 μm

Fig. 5 SEM image of multiple parallel grooved structure. (a) Spacing is 75 μm; (b) spacing is 150 μm

将微沟槽样件与表面抛光的钛合金片进行大鼠骨髓间充质干细胞培养的对照实验。细胞直径尺度在几十微米量级,根据图 6 显示,通过细胞核分布的对比发现,相比于抛光钛合金组,微造型样件可以观测到更多的细胞粘附在微沟槽上,这意味着微沟槽造型对于细胞粘附有着明显的增益。实验表明,微沟槽的排布密度对细胞粘附效果影响不大:统计细胞核数目,在相同沟槽深度条件下,间距 75 μm 和间距 150 μm 的微沟槽样件表面细胞增殖粘附效果并无较明显区别。然而,微沟槽的深度对细胞粘附效果的影响非常显著。从图中可以看出,在 6 组微造型样件的细胞培养中,沟槽深度为 1.0 μm 时,微造型样件的细胞粘附能力最好,样件表面的细胞核分布最多。而随着沟槽深度的增加,细胞的粘附效果有所减弱,当沟槽深度达到最深的 4.0 μm 时,细胞粘附能力增益最少。但是,通过对样件细胞肌动蛋白骨架染色可以发现,更深的沟槽有利于引导细胞生长。随着沟槽深度的增加,细胞的骨架逐渐形成沿沟槽方向生长的梭形,附着在沟槽之间的细胞也会伸出更多的伪足,并且沟槽越深,这一现象越明显。同时,观测样件中的细胞分布可知,细胞倾向于沿着沟槽聚集生长,而更深的沟槽更容易引导细胞沿沟槽分布,如样件组 1# 和 2# 所示。样件的表面形貌在细胞与材料的相互作用中起着重要的作用,这种表面形貌引导细胞表现出特征方向和形貌被称为细胞的接触引导。

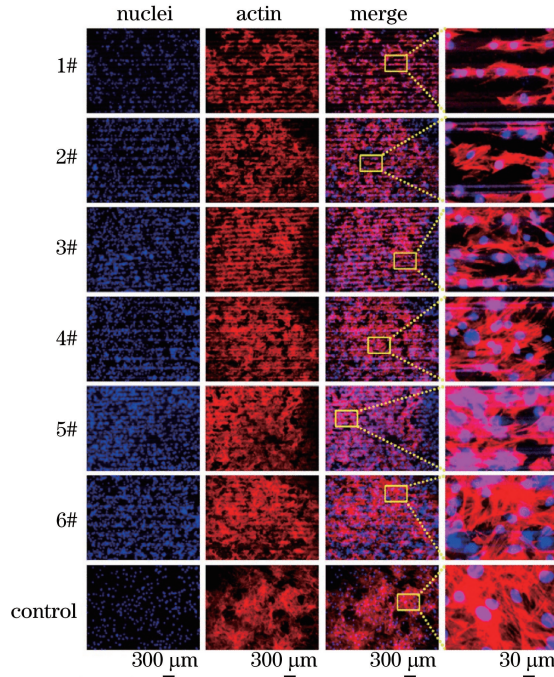


图 6 细胞培养及肌动蛋白骨架图
Fig. 6 Cell culture and actin cytoskeleton

4 结 论

实验研究了皮秒激光加工参数对表面微造型形貌的影响,从激光加工质量和微沟槽具体尺寸两方面入手,确立最优工艺参数,实现医用钛合金植入物激光微造型的可控性和可重复性。进行了生物医学实验,通过大鼠骨髓间充质干细胞的培养和细胞骨架观测,验证了微造型对生物相容性的影响,得出以下结论。

1) 对于微沟槽造型,加工质量主要受激光功率、扫描速度和重复频率的影响,选择合适的脉冲重叠系数,有利于提高微沟槽的质量。

2) 实验发现沟槽的宽度主要由光斑大小决定;而沟槽深度与激光功率、扫描次数呈正相关,与扫描速度呈负相关。通过重复性实验表明,在激光功率约 20 W,扫描速度 1200~2400 mm/s 时,可以加工出质量较好且深度准确的微沟槽造型。

3) 通过特定深度 4.0, 2.5, 1.0 μm , 间距 75 μm / 150 μm 的微沟槽样件对照抛光钛合金片进行生物相容性实验。研究表明,激光微造型能够提高钛合金表面生物相容性。微沟槽造型有助于细胞的粘附增殖并对细胞生长起到接触引导的作用。随着沟槽深度的增加,粘附效果减弱,但对细胞接触引导作用更明显。

参 考 文 献

- [1] Vorobyev A Y, Guo C. Femtosecond laser structuring of titanium implants[J]. Applied Surface Science, 2007, 253(17): 7272-7280.
- [2] Zhang W J, Li Z H, Huang Q F, *et al.* Effects of a hybrid micro/nanorod topography - modified titanium implant on adhesion and osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. International Journal of Nanomedicine, 2013, 8: 257-265.
- [3] Zhang W J, Li Z H, Liu Y, *et al.* Biofunctionalization of a titanium surface with a nano-sawtooth structure regulates the behavior of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. International Journal of Nanomedicine, 2012, 7: 4459-4472.
- [4] Bathomarco R V, Solorzano G, Elias C N, *et al.* Atomic force microscopy analysis of different surface treatments of Ti dental implant surfaces[J]. Applied Surface Science, 2004, 233(1-4): 29-34.
- [5] Vanzillotta P S, Sader M S, Bastos I N, *et al.* Improvement of *in vitro* titanium bioactivity by three different surface treatments[J]. Dental Materials, 2006, 22(3): 275-282.
- [6] Wang Dongsheng, Tian Zongjun, Shen Lida, *et al.* Microstructure and formation mechanism of plasma-sprayed nanostructured composite ceramic coatings[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2009, 19(1): 77-83.
王东生, 田宗军, 沈理达, 等. 等离子喷涂纳米复合陶瓷涂层的组织结构及其形成机理[J]. 中国有色金属学报, 2009, 19(1): 77-83.
- [7] Song Jinlong, Xu Wenji, Lu Yao, *et al.* Research on electrochemical and chemical machining technology of superamphiphobic surfaces on Al sub[J]. Journal of Mechanical Engineering, 2013, 49(5): 182-190.
宋金龙, 徐文骥, 陆 遥, 等. 电化学和化学加工法制备铝基体超双疏表面[J]. 机械工程学报, 2013, 49(5): 182-190.
- [8] Cho S A, Jung S K. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia[J]. Biomaterials, 2003, 24(26): 4859-4863.
- [9] Trtica M, Gakovic B, Batani D, *et al.* Surface modifications of a titanium implant by a picosecond Nd:YAG laser operating at 1064 and 532 nm[J]. Applied Surface Science, 2006, 253(5): 2551-2556.
- [10] Huang Zhihui, Liu Huixia, Shen Zongbao, *et al.* Process parameters analysis on surface texturing under laser shock peening[J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0503004.
黄志辉, 刘会霞, 沈宗宝, 等. 工艺参数对激光冲击微造型效果的影响[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0503004.
- [11] Liu Huixia, Yang Shengjun, Wang Xiao, *et al.* Experiment study and numerical simulation of pulsed laser ablation crater[J]. Chinese J Lasers, 2009, 36(1): 219-223.
刘会霞, 杨胜军, 王 霄, 等. 脉冲激光烧蚀凹腔的实验分析及数值模拟[J]. 中国激光, 2009, 36(1): 219-223.
- [12] Bereznai M, Pelsoczi I, Toth Z, *et al.* Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material[J]. Biomaterials, 2003, 24(23): 4197-4203.
- [13] Yang Jianjun. Femtosecond laser "cold" micro-machining and its advanced applications[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2004, 41(3): 42-52.
杨建军. 飞秒激光超精细"冷"加工技术及其应用(1)[J]. 激光与光电子学进展, 2004, 41(3): 42-52.
- [14] Wang Dongsheng, Tian Zongjun, Shen Lida, *et al.* Research states of laser surface modification technology on titanium alloys[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2008, 45(6): 24-32.
王东生, 田宗军, 沈理达, 等. 钛合金激光表面改性技术研究现状[J]. 激光与光电子学进展, 2008, 45(6): 24-32.
- [15] He Fei, Cheng Ya. Femtosecond laser micromachining: frontier in laser precision micromachining[J]. Chinese J Lasers, 2007, 34(5): 595-622.
何 飞, 程 亚. 飞秒激光微加工: 激光精密加工领域的新前沿[J]. 中国激光, 2007, 34(5): 595-622.