

# The Effects of Heat Treatment Temperature to the Biocompatibility of Titania Nanotubes

Wenjun Li, Xin Li, Jin Wang\*

Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials of Ministry of Education, Southwest Jiaotong University, Chengdu Sichuan

Email: wangjin@swjtu.edu.cn

Received: May 8<sup>th</sup>, 2017; accepted: May 24<sup>th</sup>, 2017; published: May 27<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

Titanium has excellent mechanical properties and good biocompatibility, and it is one alternative materials for medical devices. The highly ordered titanium dioxide nanotube (TNT) films could be prepared on the surface of titanium with the method of anodic oxidation technology, and the TNT film could regulate the adhesion and growth behavior of various cells on the surfaces. In this study, the homogeneous and ordered TNT films were prepared using the anodic oxidation method, and the electrolyte consisted of glycerol and ammonium fluoride. Meanwhile, the diameter of the TNT was about 100 nm. Then, the prepared TNT films were annealed by 300°C, 450°C and 600°C, respectively where after three kinds of TNT films with different crystal forms were obtained. Subsequently, platelet adhesion and smooth muscle cell growth behavior was evaluated, and the results indicated that the TNT film with anatase crystal structure obtained by heat treated at 300°C could effectively inhibit the proliferation of smooth muscle cells. The TNT film with 600°C treatment could effectively reduce the number of the adhered platelet. This study could provide theoretical support of the application of TNT materials in the cardiovascular implant devices.

## Keywords

Titania Nanotubes, Heat Treatment, Biocompatibility, Platelets, Smooth Muscle

---

# 不同热处理温度对氧化钛纳米管生物相容性的影响

李文君, 李欣, 王进\*

西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室, 四川 成都

Email: wangjin@swjtu.edu.cn

---

\*通讯作者。

收稿日期：2017年5月8日；录用日期：2017年5月24日；发布日期：2017年5月27日

## 摘要

钛金属具有优异的机械性能和良好的生物相容性，是医用植入材料的理想备选材料。通过阳极氧化手段在钛金属表面制备有序的纳米管结构能够调控多种细胞在其表面的粘附和生长行为。本研究以丙三醇、氟化铵为电解液制备出均匀有序的二氧化钛纳米管薄膜(TNT)，制得的TNT管径约为100 nm。随后分别在300℃、450℃和600℃ 3个不同温度下进行热处理，得到三种不同晶型的纳米管薄膜。经过血小板粘附、平滑肌细胞增殖等一系列评价表明300℃热处理得到的锐钛矿晶型结构的TNT能够有效的抑制平滑肌增殖，600℃热处理的金红石晶型为主的TNT能够有效的抗血小板粘附。本研究可以为钛纳米管阵列在心血管植入材料中的应用提供理论支持。

## 关键词

二氧化钛纳米管，热处理，生物相容性，血小板，平滑肌细胞

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

冠心病是目前全球死亡率最高的疾病，随着生活水平的提高，冠心病的发病率也逐年升高，大大威胁着人类的健康和生命[1]。运用微创介入治疗技术在冠脉狭窄部位植入血管支架是目前治疗冠心病的一种有效的手段[2]。然而，晚期血栓和再狭窄等并发症的发生影响了血管支架介入治疗的临床远期疗效，因此解决血管支架临床应用中晚期血栓和再狭窄依然是支架开发中的一大难题[3]。血管支架植入过程中血管内皮的损伤和炎症导致的平滑肌细胞增生和支架材料的血液相容性不足是再狭窄和晚期血栓发生的一个主要因素[4][5]。因此血液相容性良好，同时能够抑制平滑肌细胞增生的支架材料是开发心血管器械的理想材料。

钛具有良好的机械性能，优异的抗腐蚀性能和良好的生物相容性，被作为医用植入材料进行大量的研究[6]。用阳极氧化技术可以在钛金属材料表面制备高度有序的纳米管结构，纳米管的管径为20-250 nm，深度可达到1 mm。有研究表明在钛表面的氧化钛纳米管阵列(TNT)，能够更有效的促进成骨细胞的粘附和增殖等[7]，TNT还可以抑制白细胞的激活和炎症因子的分泌[8]，具有较低的免疫原性。Peng等研究发现，TNT还可以选择性的促进内皮细胞的增殖和迁移，同时抑制平滑肌细胞的生长和限制平滑肌细胞的尺寸[9]。这些研究表明，这种特殊结构的氧化钛纳米管在新型支架材料或心血管植入器械的开发中具有很大的应用前景。热处理温度对二氧化钛纳米管的晶型结构和表面特性均有一定的影响[10]，细胞在不同晶体结构和表面特性材料表面的生长行为差异很大[11][12]。但是目前尚未见关于不同热处理温度对于TNT表面血管细胞生长行为影响的研究。本研究采用3个不同温度对阳极氧化法制得的TNT薄膜进行热处理，研究不同的热处理温度对TNT表面特性、晶体结构和生物相容性的影响。

## 2. 材料

钛箔，纯度99.5%，厚度50 μm，由陕西宝鸡有色金属有限公司提供；氯化铜、氟化铵，分析纯，由

成都科龙试剂有限责任公司提供；所用血液由成都市血液中心提供。

### 3. 方法

#### 3.1. 氧化钛纳米管薄膜的制备

将钛箔用剪刀剪成 4 cm × 5 cm 的片材，并依次用丙酮、无水乙醇、去离子水在超声清洗设备中超声清洗各 5~10 min，每种试剂清洗三次，除去表面油渍污渍，密封保存备用。

按照如表 1 所示的浓度配制电解液，以钛箔为阳极，对阴极为石墨，将电压设置为 20 V 进行阳极氧化处理 3 h。

#### 3.2. 热处理

将经过阳极氧化后的样品通过 300℃、450℃、600℃ 的高温处理 4 个小时，取出样品分别用丙酮、酒精和去离子水超声清洗 3 次每次 3 min，烘干保存备用。

#### 3.3. 薄膜表面形貌，晶体结果和化学组成性能评价

本文采用 Perkin Elmer 16PC 型 X 射线光电子能谱仪，对样品表面各种元素的百分含量进行测量；采用 Quanta200 型环境扫描电子显微镜(荷兰 FEI 公司)，对样品的表面形貌进行表征；本文采用 X 射线衍射仪(X-Ray Diffraction, XRD, 型号：荷兰 PhilipsX' Pert Pro)对材料的晶体结构类型进行分析，采用小角度掠射(0.5°)，扫描范围 20°~80°，扫描步长 0.03°。

#### 3.4. 血小板粘附与激活

取新鲜人血并于 1500 r/min 离心 15 min，取上清液，获得富板浆(PRP)；各取富板浆 50 μL 滴加至样品表面，放入恒温水浴过 37℃ 孵育 1 h；孵育结束后用 PBS 清洗样品三次，洗去表面物理吸附的血小板；清洗结束后再用 2.5%的戊二醛溶液室温固定过夜；将固定好的样品用 PBS 洗净吹干，进行 P 选择素染色观测血小板粘附和激活情况。

LDH 法检测血小板粘附定量分析：在各样品表面加入 60 μL PRP，并在 37℃ 孵育 45 min 后用 PBS 清洗样品表面三次。随后在样品表面滴加 40 μL 的 Triton-X-100 (稀释到 1%)处理 5 min 后，取出 25 μL 的裂解液加入预先加有 200 μL NADH 和丙酮酸钠的 96 孔板中，用酶标仪读取其在 340 nm 处的吸光度。

#### 3.5. 平滑肌细胞生长行为评价

将取自于人脐动脉的平滑肌细胞分别滴入装有样品的 24 孔板中，并置于恒温细胞培养箱中培养 1 d 和 3 d。之后，取出样品，吸取细胞悬液，每孔加入 350 μL 含有 10% (体积分数)CCK-8 试剂的 M199 全液。恒温培养箱中孵化 4 h 后，溶液移入 96 孔板中，用酶标仪读取其在 450 nm 处的吸光度。

取出培养平滑肌细胞不同时间的样品，用磷酸盐缓冲液洗去未粘附的细胞，用 2.5%的戊二醛溶液固定。在样品表面滴加 50 μL 罗丹明试剂，避光静置 15 min，清洗 3 次，避光保存。用荧光显微镜观察平滑肌细胞并拍照。

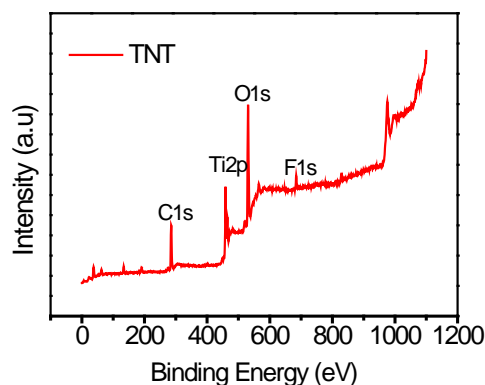
## 4. 结果与讨论

#### 4.1. 氧化钛纳米管薄膜材料学分析

XPS 检测结果如图 1 所示，经过阳极氧化后钛金属表面出现了 C1s、Ti2p、O1s、F1s 的光电子峰，其中 C 和 F 的引入可能是由于电解液中存在丙三醇和氟化铵，而在阳极氧化的过程中电解液的组分会参与钛纳米管的形成过程，因此出现了 C 和 F 的光电子峰。

**Table 1.** The composition of the electrolyte**表 1.** 电解液成分

试剂	氯化钠	氟化铵	丙三醇	去离子水
浓度	0.58 g	1.5 g	120 ml	30 ml

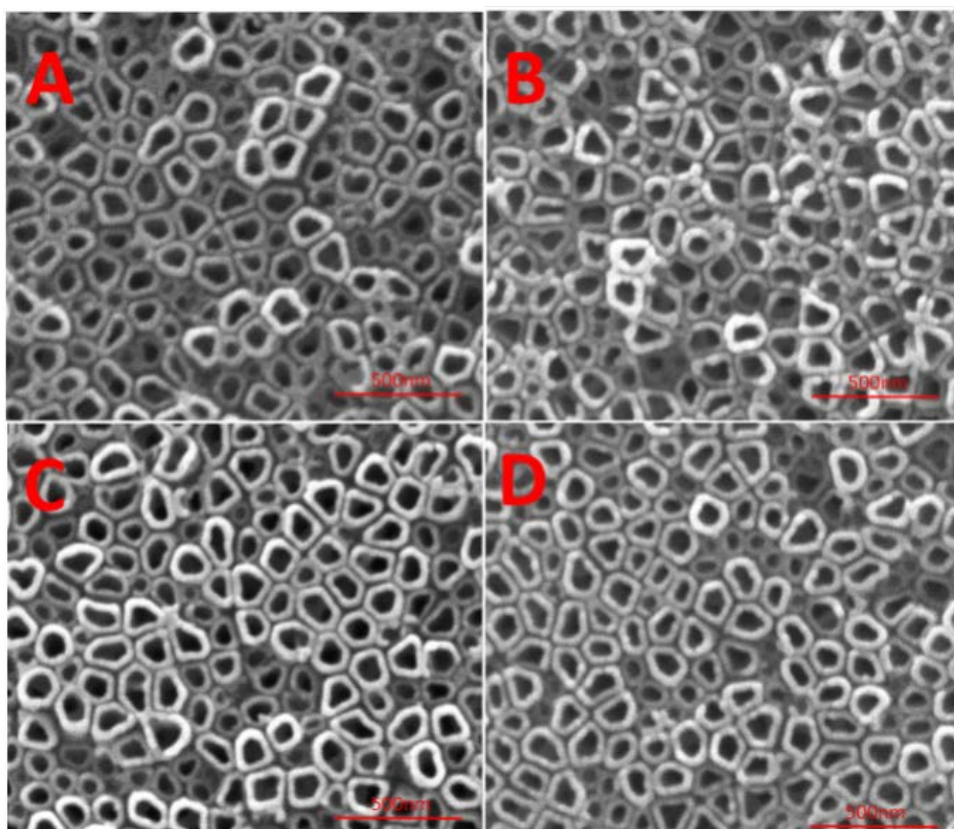
**Figure 1.** XPS result of TNT surface**图 1.** TNT 表面 XPS 结果

SEM 的检测结果显示, 钛金属作为阳极在丙三醇和氟化铵的电解液中经过 4 个小时的氧化过程, 在其表面形成了氧化钛的纳米管阵列(图 2)。由图 a 可以发现经过阳极氧化处理获得的纳米管的内径约为 80~100 nm, 管壁约为 20 nm 左右。随后对获得的钛纳米管分别进行 300℃、450℃和 600℃的退火处理。通过退火后的扫描电镜照片可以看出, 不同温度的热处理后钛纳米管的结构依然存在, 表面形貌、管径和管壁的尺寸变化不大。

XRD 结果表明(图 3), 经过阳极氧化制得的纳米管阵列在退火前没有出现锐钛矿、金红石或板钛矿的衍射峰, 证明该方法制得的 TNT 没有晶体结构是无定型结构, 经过 300℃热处理后, XRD 的结果中出现了锐钛矿晶型的衍射峰, 说明经过 300℃热处理后, 纳米管阵列由无定型结构转变为锐钛矿结构。从 450℃热处理后的 XRD 结果可以看出, 450℃退火后氧化钛纳米管中同时出现了锐钛矿和金红石两种晶型结构, 其中锐钛矿的晶型结构含量较高, 为主要的晶体结构。从 600℃热处理的结果可以看出, 600℃退火后氧化钛纳米管的结构中同时存在锐钛矿和金红石两种晶型, 其中金红石结构含量较高。XRD 的结果说明, 通过热处理可以使阳极氧化获得的无定型结构的钛纳米管转变为具有一定晶型的钛纳米管阵列。在退火温度较低时, 形成的为锐钛矿晶型, 而随着退火温度的升高, 则逐渐出现金红石型的晶体结构, 热处理温度越高金红石的含量越高。这是由于锐钛矿晶型为亚稳相, 而金红石晶型为热力学稳定相[13]。当退火温度升高时, 晶体表面的表面能升高, 金红石相在锐钛矿相的界面成核然后逐步扩散至锐钛矿相内部[14]。这种转变过程是很缓慢的, 因此随着温度升高呈现出金红石相逐渐的趋势。

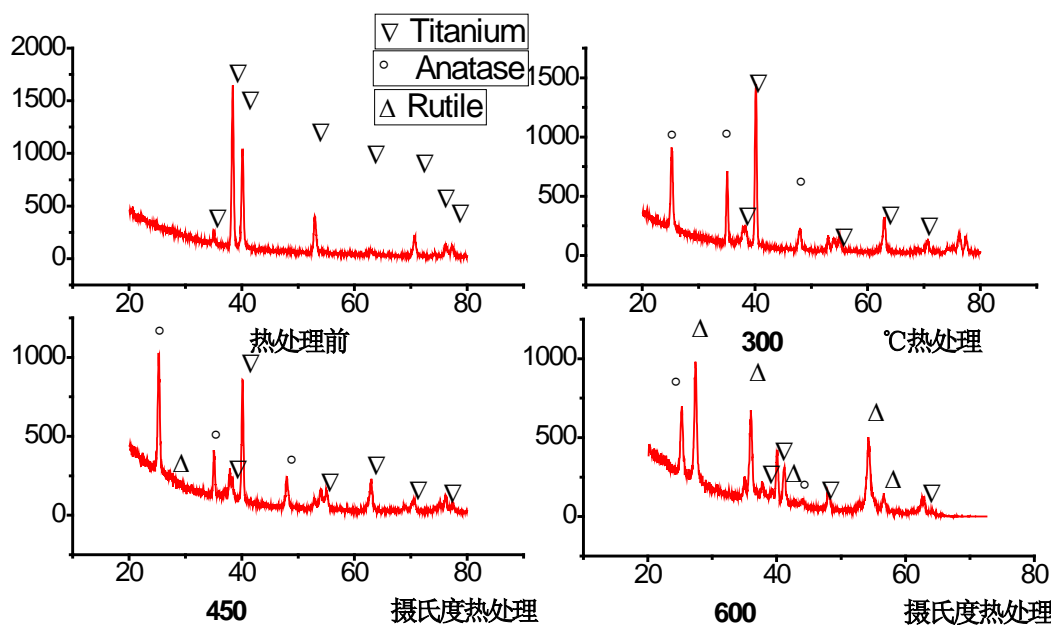
#### 4.2. 血小板粘附和激活评价

随后, 对阳极氧化获得的四种纳米管表面的血小板粘附和激活情况进行了评价, 其中图 4(a)为各样品的免疫荧光染色, 图 4(b)为各样品的 LDH 检测结果。从免疫荧光染色的结果(图 4(a))可以看出平板钛金属、未热处理和 300℃热处理的钛纳米管表面有大量激活的血小板粘附, 并且血小板呈现出大量聚集的状态, 证明这三种样品表面的血小板激活程度较高。而 450℃和 600℃热处理的纳米管表面血小板的激活数量相比与其他三个样品较少, 600℃热处理的纳米管表面血小板的激活数量最少。LDH 血小板粘附数量检测的结果如图(4(b))所示, 可以看出未热处理的 TNT 表面粘附的血小板的数量明显低于平板钛表



**Figure 2.** SEM results of TNT and TNT samples by heat treated at 300°C, 450°C and 600°C (A: TNT; B, C, D are TNT samples by heat treated at 300°C, 450°C and 600°C)

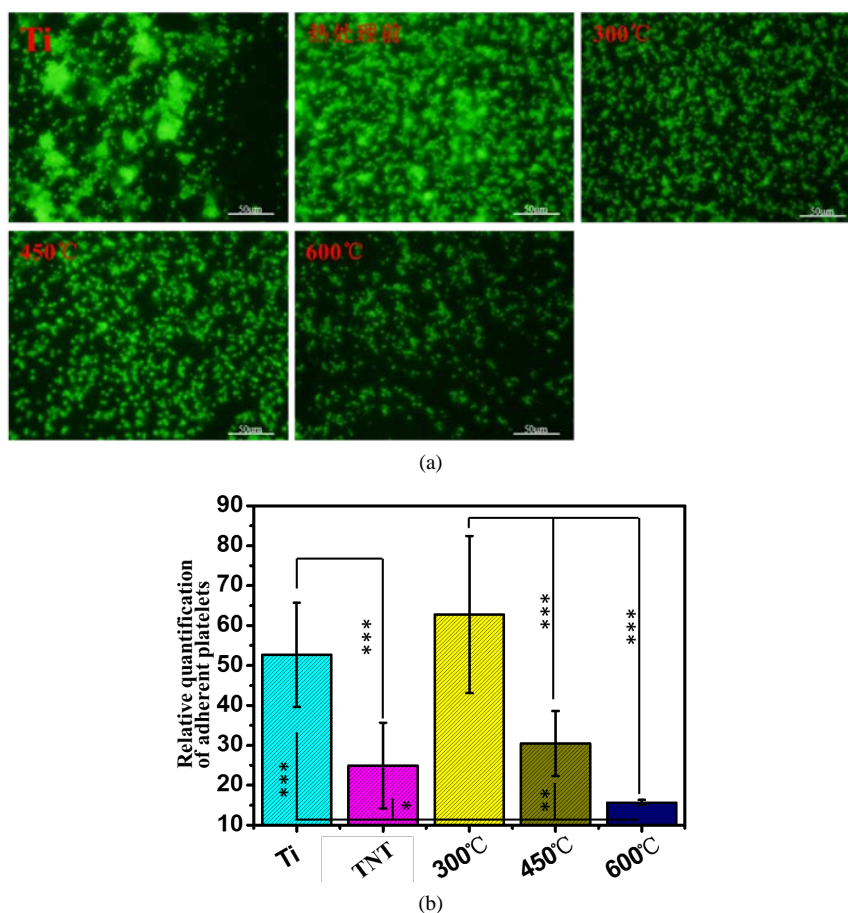
**图 2.** TNT 与 300°C、450°C、600°C 不同温度热处理后 TNT 的 SEM 结果(A: TNT; B、C、D 分别为 300°C、450°C、600°C 热处理后的 TNT)



**Figure 3.** XRD results of TNT and TNT samples by heat treated at 300°C, 450°C and 600°C

**图 3.** 热处理前与 300°C、450°C、600°C 不同温度热处理后的 XRD 结果





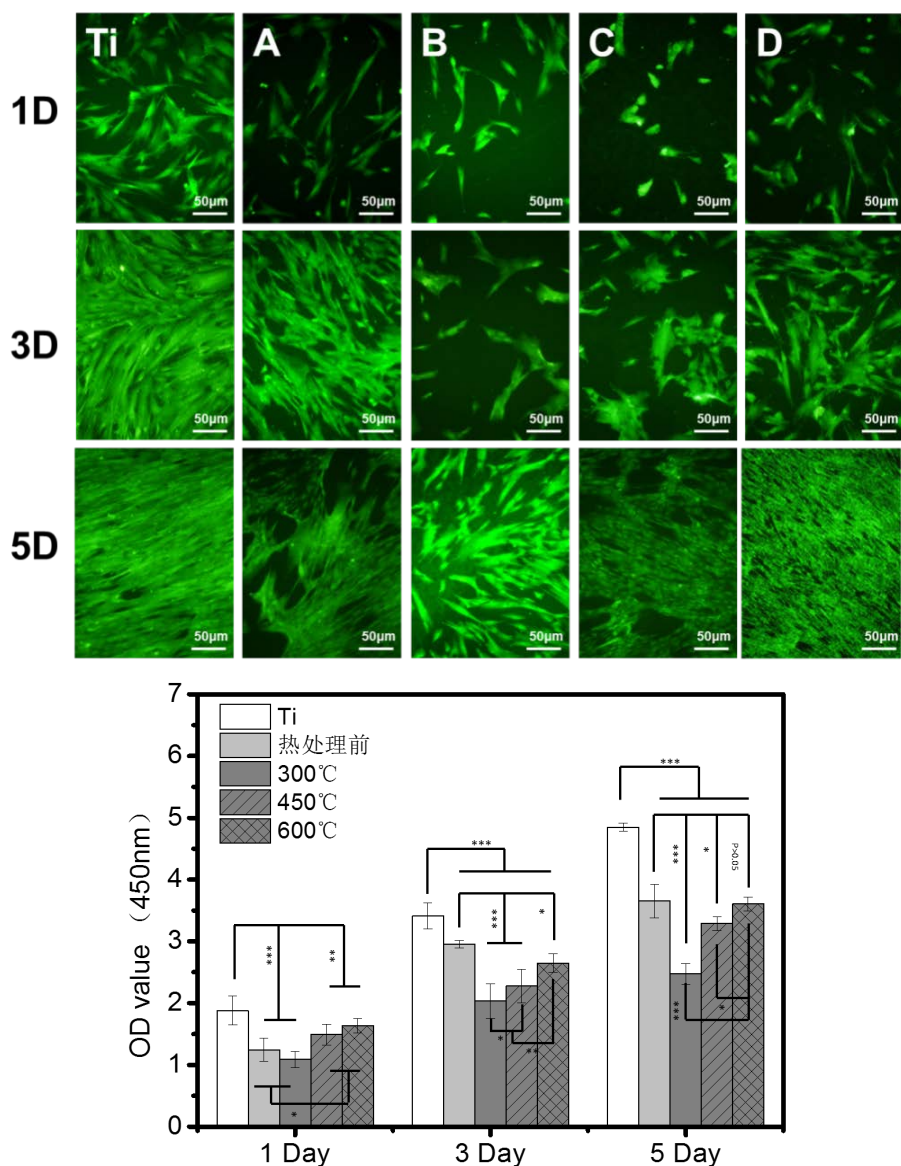
**Figure 4.** Staining of platelets and LDH assay results of TNT and TNT samples by heat treated at 300°C, 450°C and 600°C ((a) Staining of platelets seeded onto TNT and TNT samples by heat treated at 300°C, 450°C and 600°C; (b) LDH assay)

**图 4.** 热处理前与 300°C、450°C、600°C 不同温度热处理后血小板粘附与激活结果。((a) 免疫荧光染色; (b) LDH 分析)

面粘附的血小板的数量。而 300°C 热处理的 TNT 表面粘附的血小板的数量相比与未热处理的 TNT 明显增加。而 450°C 热处理的 TNT 表面血小板的粘附数量明显少于 300°C 热处理的 TNT 表面。600°C 热处理的 TNT 相比与其他 4 种样品表面血小板的粘附数量最少。血小板免疫荧光染色和 LDH 检测的结果表明通过不同温度的退火可以调控 TNT 表面血小板的粘附数量和激活情况，退火温度越高血小板粘附和激活的数量均越少。这可能与不同退火温度得到 TNT 的晶型不同有关，其中金红石含量高的 TNT 表面血小板粘附和激活的数量均较少。

### 4.3. 平滑肌细胞染色和 CCK-8 结果

样品表面平滑肌细胞罗丹明染色和 CCK-8 检测结果如图 5 所示，可以看出培养 1 天时，相比于平板样品，纳米管表面的 SMCs 数量明显较少。培养 3 天时，于 1 天的荧光照片相比，各样品表面的细胞数量均有所增加，其中平板 Ti 样品表面的基本被 SMCs 覆盖，而 300°C 退火处理的 TNT 表面的 SMCs 跟其他样品相比数量较少。培养 5 天后，平板钛表面的 SMCs 变得更为细长，同时呈现多层生长的状态。未热处理的 TNT 表面的 SMCs 呈现聚集且多层生长的状态，样品表面部分区域无 SMCs 覆盖。而三种不同温度处理的 TNT 表面的 SMCs 显示出不同的生长情况。300°C 退火处理的 TNT 表面的 SMCs 数量明显少



**Figure 5.** Staining of smooth muscle cells and CCK-8 results of TNT and TNT samples by heat treated at 300°C, 450°C and 600°C (A: TNT; B, C, D are TNT samples by heat treated at 300°C, 450°C and 600°C)

**图 5.** 热处理前与 300°C、450°C、600°C 不同温度热处理后的平滑肌细胞染色和 CCK-8 结果(A: TNT; B、C、D 组分别为经过 300°C、450°C、600°C 热处理后的 TNT 试样)

于另外两组热处理样品。而 600°C 退火处理的 TNT 表面基本被 SMCs 所覆盖。从 CCK-8 的结果可以看出，培养 1 天时，与平板钛相比，TNT 样品表面的 SMCs 增殖活性均低于平板钛表面。而三种不同温度退火处理的 TNT 表面 SMCs 的增殖活性以此为 600°C > 450°C > 300°C。不同时间点的样品表面的 SMCs 生长情况与 1 天的生长规律一致。SMCs 培养的结果说明 TNT 的热处理温度能够影响其表面 SMCs 的生长行为，这可能与不同温度退火处理得到的 TNT 薄膜的晶型不同相关。研究表明，不同晶型的氧化钛其表面血浆蛋白的粘附行为不同，没有经过热处理的氧化钛表面在 12 h 后有比热处理过后的氧化钛表面更少的蛋白吸附量[15]。因此这三种退火温度得到的 TNT 可能通过调控血浆蛋白在其表面的粘附行为来干预 SMCs 的生长。

血栓及再狭窄是目前心血管材料临床应用中的两大难题,影响了心血管器械的远期疗效。材料表面血液相容性不足是心血管材料表面血栓产生的一个主要因素[16]。血小板与心血管材料相互作用是研究材料血液相容性的一个重要方面。因此血小板的粘附和激活行为是评价材料血液相容性的一个重要指标[17]。而再狭窄的产生则是由于血管中膜层的 SMCs 的过度增生和向内膜层的迁移[18] [19]。上述血小板粘附和激活结果和 SMCs 增殖结果表明,高温 600℃ 热处理得到的金红石晶型的 TNT 表面粘附和激活的血小板数量更低,可能具有减少由于血小板活化而引起的凝血行为,具有更好的血液相容性。而 300℃ 退火处理得到的 TNT 表面 SMCs 具有较低的增殖能力,能够减少 SMCs 的过度增殖,减少血管内膜的增生,对于减少内膜增生而引起的血管再狭窄具有积极的作用。以上研究结果表明锐钛矿相的 TNT 具有更好的血液相容性,而金红石相的 TNT 能够抑制 SMCs 的增殖有利于抑制再狭窄。

## 5. 结论

本研究对采用阳极氧化方法制备的 TNT 进行 300℃、450℃ 和 600℃ 三个不同稳定的热处理,得到了三种不同晶型的 TNT 薄膜,300℃ 退火得到的锐钛矿型的 TNT 表面具有良好的血液相容性,而 600℃ 退火得到的金红石晶型为主的 TNT 能够抑制 SMCs 的增殖对于抑制再狭窄具有积极的作用。本研究通过改变 TNT 薄膜的晶型来调控其表现的血液相容性和细胞生长行为,可以为 TNT 的在心血管器械中应用提供支持。

## 参考文献 (References)

- [1] Carney, R.M. and Freedland, K.E. (2016) Depression and Coronary Heart Disease. *Nature Reviews Cardiology*, **14**, 145-155. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.181>
- [2] Diegeler, A., Thiele, H., Falk, V., et al. (2002) Comparison of Stenting with Minimally Invasive Bypass Surgery for Stenosis of the Left Anterior Descending Coronary Artery. *The New England Journal of Medicine*, **347**, 561-566. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013563>
- [3] 潘长江, 王进, 黄楠. 血管支架内再狭窄的研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2004, 23(2): 152-156.
- [4] Farb, A., Weber, D.K., Kolodgie, F.D., et al. (2002) Morphological Predictors of Restenosis after Coronary Stenting in Humans. *Circulation*, **105**, 2974-2980. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000019071.72887.BD>
- [5] Behrendt, D. and Ganz, P. (2002) Endothelial Function: From Vascular Biology to Clinical Applications. *The American Journal of Cardiology*, **90**, L40-L48. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(02\)02963-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(02)02963-6)
- [6] Zhu, Y.T., Lowe, T.C., Valiev, R.Z., et al. (2002) Ultrafine-Grained Titanium for Medical Implants. Google Patents.
- [7] Oh, S., Daraio, C., Chen, L.H., et al. (2006) Significantly Accelerated Osteoblast Cell Growth on Aligned TiO<sub>2</sub> Nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **78A**, 97-103. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30722>
- [8] 何娉婷. TiO<sub>2</sub> 纳米粒子和纳米管的生物学效应及其在 PP 复合材料中抗菌作用的研究[D]: [博士学位论文]. 南京: 南京航空航天大学, 2012.
- [9] Peng, L., Eltgroth, M.L., Latempa, T.J., et al. (2009) The Effect of TiO<sub>2</sub> Nanotubes on Endothelial Function and Smooth Muscle Proliferation. *Biomaterials*, **30**, 1268-1272. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.012>
- [10] Du, Z., Xiao, S., Xu, L., et al. (2014) Effect of Heat Treatment on Microstructure and Mechanical Properties of a New  $\beta$  High Strength Titanium Alloy. *Materials & Design*, **55**, 183-190.
- [11] Yao, X., Peng, R. and Ding, J. (2013) Cell-Material Interactions Revealed via Material Techniques of Surface Patterning. *Advanced Materials*, **25**, 5257-5286. <https://doi.org/10.1002/adma.201301762>
- [12] Zhang, S., Yang, D., Jing, D., et al. (2014) Enhanced Photodynamic Therapy of Mixed Phase TiO<sub>2</sub> (B)/Anatase Nanofibers for Killing of HeLa Cells. *Nano Research*, **7**, 1659-1669. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0526-8>
- [13] Kandiel, T.A., Robben, L., Alkaim, A., et al. (2013) Brookite versus Anatase TiO<sub>2</sub> Photocatalysts: Phase Transformations and Photocatalytic Activities. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **12**, 602-609. <https://doi.org/10.1039/C2PP25217A>
- [14] 王晖, 吕德义, 郇昌永, 等. 金红石型纳米 TiO<sub>2</sub> 的制备[J]. 化学通报, 2004, 67(5): 394.
- [15] 刘洋. 基于 TiO<sub>2</sub> 纳米棒的表面改性及其与细胞/蛋白的相互作用研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学,



2013.

- [16] Trant, J.F., Mceachran, M.J., Sran, I., *et al.* (2015) Covalent Polyisobutylene-Paclitaxel Conjugates for Controlled Release from Potential Vascular Stent Coatings. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7**, 14506-14517. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04001>
- [17] Kasirer-Friede, A. and Shattil, S.J. (2017) Regulation of Platelet Adhesion Receptors. In: Gresele, P., Kleiman, N.S., Lopez, J.A. and Page, C.P., Eds., *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*, Springer, Berlin, 69-84. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47462-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47462-5_6)
- [18] Faxon, D.P., Coats, W. and Currier, J. (1997) Remodeling of the Coronary Artery after Vascular Injury. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **40**, 129-140. [https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(97\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(97)80005-9)
- [19] Libby, P. and Tanaka, H. (1997) The Molecular Bases of Restenosis. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **40**, 97-106. [https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(97\)80002-3](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(97)80002-3)

**期刊投稿者将享受如下服务:**

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ms@hanspub.org](mailto:ms@hanspub.org)