

TiCuO 薄膜的显微结构对 Cu 离子 释放和内皮细胞行为的影响

程丹¹, 黄斌¹, 陈涛¹, 景凤娟¹, 谢东², 冷永祥¹, 黄楠¹

(西南交通大学 1. 材料科学与工程学院, 先进材料技术教育部重点实验室; 2. 物理科学与技术学院, 成都 610031)

摘要: 采用直流磁控溅射技术, 在 Si 片和 316L SS 基体上制备了不同 Cu 含量的 TiCuO 薄膜。采用 X 射线衍射仪(XRD)、透射电镜(TEM)、X 射线能谱仪(EDS)和 X 射线光电子能谱(XPS)对薄膜的显微结构和化学组成进行了分析。采用电化学腐蚀和模拟体液浸泡实验评价了薄膜的腐蚀性能和 Cu 离子释放特性。体外静态培养内皮细胞后, 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)评价了 TiCuO 薄膜的细胞活性。研究表明, 未掺杂的 TiO₂ 薄膜为金红石相, 掺入 Cu 后的 TiCuO 薄膜由非晶基体上含有 Cu₂O 的纳米晶粒构成。薄膜中的富 Cu 区引起了薄膜腐蚀。含 Cu 量高的 TiCuO 薄膜更易被腐蚀, 并释放出较多 Cu 离子。TiCuO 薄膜释放出一定浓度的 Cu 离子促进了内皮细胞活性。研究表明, TiCuO 薄膜的含 Cu 量和显微结构影响了 Cu 离子释放, 对其内皮细胞活性起了关键作用。

关键词: TiCuO 薄膜; 磁控溅射; Cu 离子释放; 内皮细胞活性

中图分类号: TG178; R318 文献标识码: A

Microstructure of TiCuO Films on Copper Ion Release and Endothelial Cell Behavior

CHENG Dan¹, HUANG Bin¹, CHEN Tao¹, JING Feng-Juan¹, XIE Dong², LENG Yong-Xiang¹, HUANG Nan¹

(1. Key Laboratory for Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. School of Physics Science and Technology, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: TiCuO films with different microstructures and Cu contents were prepared on Si and 316L SS substrates using DC magnetron sputtering. The microstructure and chemical composition of the films were analyzed by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Corrosion behavior and Cu ions release properties of the films were evaluated by electrochemical corrosion and simulated body-fluid immersion tests, respectively. Endothelial cell (EC) viability on the films was evaluated by CCK-8 assay *in vitro*. Un-doped TiO₂ films exhibit rutile phases. After Cu incorporation, the TiCuO films consist of nano-crystalline grains of Cu₂O on their amorphous matrix. The films with higher Cu contents are more susceptible to corrosion and release more Cu ions. The Cu-rich phases of the films result in corrosion. EC viability is enhanced by a certain concentration of Cu ions released from TiCuO films. All above results demonstrated that microstructures and Cu contents of TiCuO films play an important role in controlling copper ions release behaviors, and therefore affect the EC viability.

Key words: TiCuO films; magnetron sputtering; Cu ions release; ECs viability

收稿日期: 2018-01-02; 收到修改稿日期: 2018-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(31300787, 31270020, U1330113)

National Natural Science Foundation of China (31300787, 31270020, U1330113)

作者简介: 程丹(1993-), 女, 硕士研究生. E-mail: chengdan1193@163.com

通讯作者: 景凤娟, 副教授. E-mail: jingfengjuan@home.swjtu.edu.cn

目前心脑血管疾病的发病率逐年升高, 严重威胁人类的健康。人工血管支架、人工心瓣、人工血泵等植入性医疗器械是治疗心脑血管疾病的有效手段。然而人体在使用这些植入物后会出现的血栓、内膜增生等问题已成了急需解决的重要问题。其原因是心血管器械在植入时会对血管内皮造成损伤, 并且由于制备这些器械的材料, 如 316 不锈钢、钴合金、钛及钛合金等材料的表面不具有生物活性, 可能会对血管造成内膜损伤而难以及时修复。同时所造成病理状态的血管内皮细胞会促进炎症、血栓和平滑肌细胞增殖等不良反应^[1]。正常功能的内皮细胞是防止血栓形成的天然屏障, 所以在生物材料表面上完全快速内皮化, 可有效抑制血栓和平滑肌增殖等不良反应^[2]。

由于钛及钛合金具备优良的机械性能、延展性和生物相容性, 临床上广泛用作医疗器械。Akahori 等^[3]发现钛及钛合金优良的血液相容性是由于其表面生成的稳定氧化物二氧化钛的作用。黄楠等^[4-5]研制得到的氧化钛薄膜具有较好的生物相容性, 可以提高 316L SS 支架的耐腐蚀性、化学惰性和血液相容性。但氧化钛薄膜还未达到理想的抗凝血要求, 服役期间病人还需服用抗凝药。

金属 Cu 离子是人体必需的微量元素, 正常人体中含有约 100~120 mg 的 Cu 元素^[6]。人体服用 Cu 的药用浓度高于 5.0 mg/kg 体重时才表现出毒性^[7], Cu 还是人体生命过程中许多重要酶的活性中心^[8]。研究发现, 一定浓度的 Cu 离子可以促进内皮细胞的增殖, 但并不促进平滑肌和成纤维细胞的增殖^[9-10], 还可以通过上调血管内皮生长因子的表达来促进血管生成和血管成熟^[11], 因此, 合金材料中掺入适量的 Cu, 不仅不会出现毒性, 反而会起到促进内皮细胞增殖的作用。但在合金中掺入多少 Cu、如何掺 Cu 才能使合金保持其优良的生物相容性并促进血管内皮活性, 需要进一步研究。

本研究在氧化钛体系中加入 Cu 元素, 利用磁控溅射技术制备出不同含 Cu 量的 TiCuO 薄膜, 以释放 Cu 离子和促进内皮细胞活性。目前, TiCuO 薄膜的研究主要集中在其光催化^[12]和抗菌性能^[13-14]等, 很少有研究关注其内皮细胞相容性, 也较少有人采用透射电镜研究 TiCuO 薄膜的显微结构。本研究主要研究了 TiCuO 薄膜的组成、结构、电化学腐蚀、Cu 离子释放和内皮细胞行为, 并分析了薄膜的成分和显微结构对腐蚀、Cu 离子释放和内皮细胞行为的影响。

1 实验方法

1.1 薄膜样品的制备

采用直流磁控溅射(DCMS)技术, 改变溅射靶材中的 Cu 含量, 在 Si 片和 316L SS 基体表面制备出不同 Cu 含量的 TiCuO 复合薄膜, 薄膜厚度约为 200 nm。在矩形钛靶(纯度 99.99%, 尺寸 135 mm × 170 mm × 6 mm)的有效溅射区(跑道环)中嵌入各种数量的铜柱(纯度 99.97%), 通过改变纯 Ti 靶中 Cu 条的镶嵌量, 得到 Cu/(Ti+Cu) 面积比分别为 2.15% 和 14.5% 的 Ti-Cu 镶嵌靶材。样品 TiCuO-1、TiCuO-2 薄膜分别采用 Cu/(Ti+Cu) 的面积比为 2.15%、14.5% 的 Ti-Cu 镶嵌靶材, 样品 TiO₂ 薄膜采用钛靶(纯度 99.99%)。设置真空室基础真空为 2.0×10^{-3} Pa, 溅射沉积气压为 0.63 Pa, O₂/Ar 流量比为 12/60, 基片偏压为 -50 V, 溅射靶材和样品的距离约为 90 mm, 溅射的直流电流为 2 A。

1.2 材料表征方法

采用日本 JSM-7001F 型扫描电子显微镜附件 X 射线能谱仪(EDS)检测 Si 片基体上沉积的 TiCuO 薄膜的表面成分。使用表面台阶仪(美国 XP-2 型)测定 Si 片基体上 TiCuO 薄膜的厚度。采用 X 射线光子能谱仪(SPECS-XPS, 德国)分析 Si 片基体上 TiCuO 薄膜表面的化学键合状态, XPS 设备阳极靶为铝靶, 测试功率为 12 kV×315 mA, 真空度为 2×10^{-7} Pa。采用 X 射线衍射仪(Philips χ Pert, 荷兰)分析 Si 片基体上 TiCuO 薄膜的表面结构, 其中采用 CuK α 辐射($\lambda = 0.15406$ nm), X 射线源管电压 30 kV、电流 30 mA、掠射角 0.5°, 2 θ 扫描范围 20°~70°。采用透射电子显微镜(JEM-2100F JEOL, 日本)对 TiCuO 薄膜进行选区电子衍射和高分辨观察, 透射电镜的样品制备流程包括: 采用 1.1 所述的工艺参数, 在 NaCl 晶体上沉积 80 nm 的 TiCuO 薄膜, 用酒精和蒸馏水(2:1)混合液浸泡薄膜样品, 使 NaCl 基体和薄膜分离, 用镊子取出薄膜碎片并干燥后, 将薄膜置于铜网上进行 TEM 检测。采用电化学工作站(IM6, Zahner, 德国)测试在 316L SS 上沉积的 TiCuO 薄膜的电化学腐蚀性能, 选取 pH=7.4 的磷酸缓冲盐(PBS)标准溶液作为腐蚀溶液, 扫描速度 2 mV/s, 电位扫描范围 -1~0.8 V。参考《医疗器械生物学评价》标准, 根据 ISO 10993-12:2002 和 ISO 10993-15:2000, 将在 Si 片表面沉积的表面积为 3 cm² 的 TiCuO 薄膜浸泡于 2 mL 的标准 PBS (pH=7.4)中, 放置于 37℃ 恒温箱中, 分别浸泡 30 min 和 1、3、5、15、30 d 后取出释放液, 采用 ICP-MS 电感耦合等离子发射

光谱仪(Agilengt 725 型)设备检测 TiCuO 薄膜在不同时间内释放的 Cu 离子浓度。提取于脐带静脉的内皮细胞分别在 Si 片基体上沉积薄膜的样品表面培养 1 和 3 d 后, 利用细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)表征内皮细胞活性。步骤为: 首先在样品表面种植密度为 5×10^4 cells/cm² 的内皮细胞, 培养 1 和 3 d 后丢弃旧培养基, 接着将每个样品用 PBS 洗涤两次。再将预先配置的含有 10% CCK-8 的新鲜培养基以 350 μ L/孔加入, 放置于 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 3 h, 吸取 200 μ L/孔的反应液到 96 孔板中, 此过程注意避免光照。利用酶标仪(μ Quant, Bio-tek instruments Inc)在 450 nm 波长下测量吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 TiCuO 薄膜的成分、微观结构与结合状态

表 1 为采用 EDS 检测的 TiCuO 薄膜样品的成分分析结果, 样品 TiCuO-1 和 TiCuO-2 中 Cu 分别为 12.4at%和 23.1at%。

由直流磁控溅射制备的未掺杂的 TiO₂ 样品是金红石相结构(图 1)。含 Cu 量分别为 12.4at%和 23.1at%的 TiCuO 薄膜均为明显的非晶态结构。这是因为 Cu 的掺入阻碍了薄膜中 TiO₂ 的结晶行为^[15], 导致了明显的非晶相形成。

采用 TEM 对 TiCuO 薄膜的显微结构进行了进一步分析(图 2)。采用 TEM 获得的 TiCuO-1 样品的表面形貌(图 2(a)), 可见在灰色基体 A 中出现了大小不等的黑色颗粒 B, 颗粒大小约为 70~150 nm。

EDS 结果显示: B 区域的 Cu 含量大于 A 区域(图 2(b)), 因此 B 区域是 Cu 的富集区。区域 A 的选区电子衍射图谱显示(图 2(c)), TiCuO-1 样品的 A 区域未发现明显的衍射斑点或衍射同心圆环, 具有明显的非晶衍射特征的衍射花样, 通过 A 区域高分辨透射电子显微镜(HRTEM)结果可见其为明显的非晶结构(图 2(e)), 与 XRD 的结果一致。B 区域中有少量衍射斑点存在(图 2(d))。通过测量得到衍射晶面间距分别为 $d=0.300$ 、 0.174 和 0.151 nm, 推测 B 区域为 Cu₂O 相, 对应晶面分别是 Cu₂O(110)、Cu₂O(211)和

表 1 采用 EDS 检测 TiCuO 薄膜中的 Ti、Cu、O 元素的相对原子含量

Table 1 Atomic concentration of TiCuO films evaluated by EDS			
Sample	Cu/at%	Ti/at%	O/at%
TiCuO-1	12.4	12.3	75.3
TiCuO-2	23.1	6.7	70.2

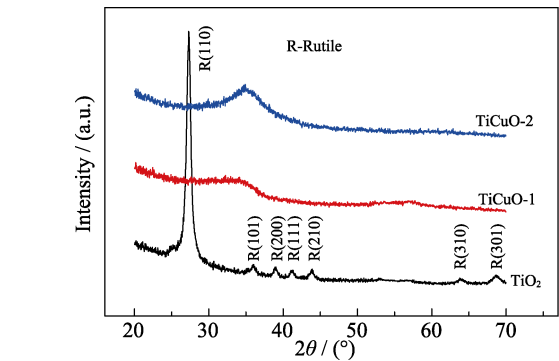


图 1 TiO₂ 和 TiCuO 样品的 XRD 图谱
Fig. 1 XRD patterns of TiO₂ and TiCuO samples

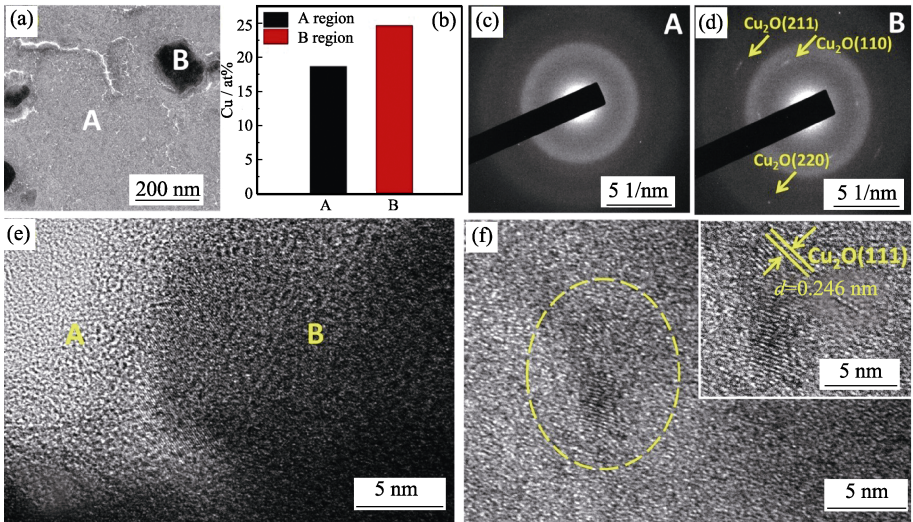


图 2 TiCuO-1 样品的 TEM 照片(a), A 和 B 区域 Cu 原子百分比(b), A(c)和 B(d)区域的选区电子衍射图(c)及其 HRTEM 形貌(e)~(f)

Fig. 2 TEM image (a), Cu contents evaluated by EDS (b), the selected area electron diffraction results of A region (c) and B region (d), and their corresponding HRTEM images (e, f), respectively, of the TiCuO-1 sample

$\text{Cu}_2\text{O}(220)$ 。图 2(f) 是 B 区域的 HRTEM 照片, 从图中观察到大部分区域是非晶区(无条纹), 局部出现了少量纳米晶(虚线框), 其晶粒大小约为 10 nm, 晶面间距为 $d=0.246$ nm, 因此推算衍射条纹可能是 $\text{Cu}_2\text{O}(111)$ 晶面。结果显示, 含 Cu 量为 12.4at% 的 TiCuO-1 样品非晶基体上存在少量 Cu_2O 纳米晶粒。

TiCuO-2 样品的 TEM 表面形貌显示, 在薄膜灰色基体 A 中也出现大小不等的黑色颗粒 B(图 3(a)), 其颗粒尺寸(约 70~300 nm)大于 TiCuO-1 样品中的颗粒(约 70~150 nm)。EDS 线扫描结果(图 3(b))显示, B 区域的含 Cu 量大于 A 区域, 因此 B 区域是 Cu 的富集区。图 3(c) 是薄膜基体 A 的选区电子衍射, 可以看出有一个散漫的衍射环和一个较宽的亮环^[16-18], 此较宽亮环的衍射晶面间距为 0.246 nm, 对应衍射晶面为 $\text{Cu}_2\text{O}(111)$, 再通过图 3(e) 中 A 区域的 HRTEM 照片可以看出区域局部存在晶粒, 测量得到晶面间距 $d=0.213$ nm, 推测发生衍射的晶面是 $\text{Cu}_2\text{O}(200)$ 。因此推测, 基体 A 区域内为非晶基体与少量细小的 Cu_2O 纳米晶粒构成。图 3(d) 是颗粒 B 区域的选区电子衍射图谱, 从中可明显看出有规则排列的衍射斑点, 其晶面间距 d 值分别为 0.302、0.122 和 0.128 nm, 对应晶面为 $\text{Cu}_2\text{O}(110)$ 、 $\text{Cu}_2\text{O}(222)$ 和 $\text{Cu}_2\text{O}(311)$ 。从 HRTEM 照片(图 3(f)) 中也可以看出 B 区域存在明显的晶粒, 测得晶面间距是 0.301 nm, 对应衍射晶面是 $\text{Cu}_2\text{O}(110)$ 晶面。因此, TiCuO-2 样品也为非晶结构与 Cu_2O 纳米晶粒共存。

图 4 是采用 Ar^+ 离子刻蚀 TiO_2 和 TiCuO 样品

表面 30 nm 后的 XPS 图谱, 表 2 是对 TiO_2 和 TiCuO 样品中的 Ti2p 和 Cu2p 进行拟合后, Ti^{4+} 、 Ti^{3+} 、 Ti^{2+} 在 Ti2p 图谱中所占面积的百分含量和 Cu^{2+} 、 Cu^+ 在 Cu2p 图谱中的所占面积的百分含量。根据文献报道, CuO 的 Cu2p 特征峰为 $\text{Cu}2p_{3/2}(933.5 \text{ eV})$ 和 $\text{Cu}2p_{1/2}(953.5 \text{ eV})$, Cu_2O 的 Cu2p 峰在 $\text{Cu}2p_{3/2}(932.5 \text{ eV})$ 和 $\text{Cu}2p_{1/2}(952.5 \text{ eV})$ ^[19], 其结合能比 CuO 的结合能低 1 eV。图 4(a) 的 Cu2p 谱图显示, 含 Cu 量较多的 TiCuO-2 样品除了在 933.5 eV 处有 CuO 的 $\text{Cu}2p_{3/2}$ 特征峰以外, 在 940.5~948.5 eV 范围内还明显出现了 Cu^{2+} 特征卫星峰, 这是 CuO 的典型特征峰^[20-22]。图 4(a) 和表 2 的结果均表明, TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品都含有 Cu_2O , 且含 Cu 量较多的 TiCuO-2 样品中还含有较少的 CuO。文献报道, 在 Cu 的氧化过程中, 首先生成 Cu_2O 结构, 然后 Cu_2O 进一步被氧化生成 CuO 结构^[23-24], 同时杂质元素会影响 Cu 的氧化过程^[25]。本研究认为, TiCuO 薄膜中的 Ti 原子的含量可能影响 Cu 原子的表面能量, 从而改变了 Cu 原子的氧化速率, 导致当 TiCuO 薄膜含较多 Ti 时获得 Cu_2O , 而 Ti 含量较少时 TiCuO 薄膜开始出现 CuO。

图 4(b) 中, 未掺 Cu 的 TiO_2 样品中存在 Ti^{4+} 、 Ti^{3+} 、 Ti^{2+} 价态, 峰位分别位于 458.9、457.6、455.2 eV, 对应 TiO_2 、 Ti_2O_3 、 TiO 结构。当掺入 Cu 后, 两种 TiCuO 薄膜中的 TiO 明显减少, 而 TiO_2 和 Ti_2O_3 增加。文献[26]报道, 金属 Cu 的加入可以在一定程度上促进 Ti 的氧化。在薄膜制备过程中, Cu 的加入可能促进了 Ti 的充分氧化, 故随着 Cu 含量的增加, TiCuO 薄膜中 TiO_2 、 Ti_2O_3 的含量同时增加, 而 TiO 含量减少。

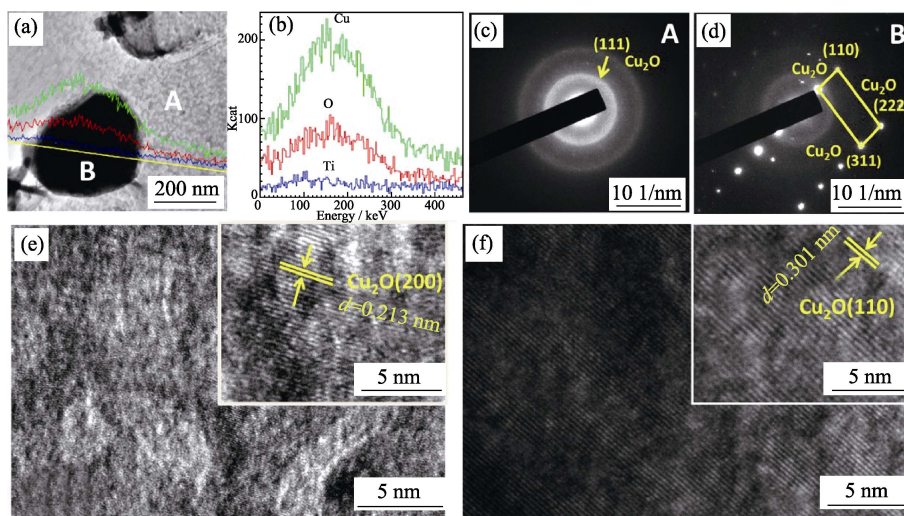


图 3 TiCuO-2 样品的 TEM 形貌照片(a), Cu、O、Ti 元素的 EDS 线扫描结果(b), A(c)和 B(d)区域的选区电子衍射图及其 HRTEM 形貌图(e)~(f)

Fig. 3 TEM image(a), corresponding line-scanning of Cu, O, Ti elements (b) across a selected area (yellow line in (a)), the selected area electron diffraction results of A region (c) and B region (d), and their corresponding HRTEM images (e, f) respectively of the TiCuO-2 sample

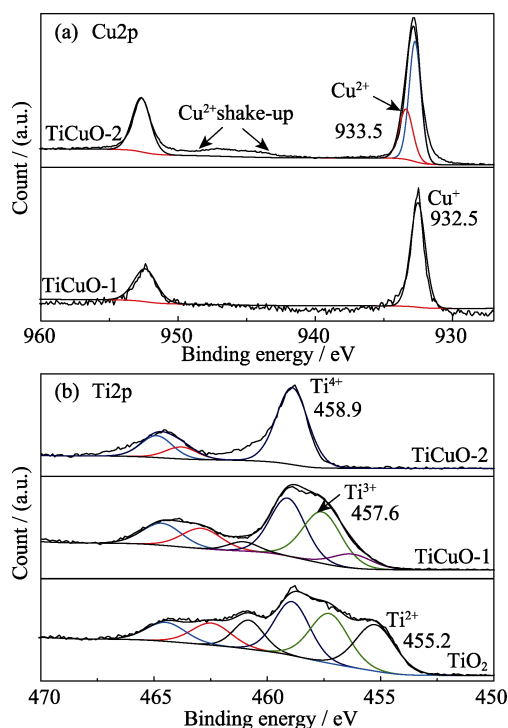


图 4 TiCuO-1 和 TiCuO-2 的 Cu (a) 和 Ti (b) XPS 图谱
Fig. 4 Cu2p (a) and Ti2p (b) XPS spectra of TiCuO-1 and TiCuO-2 films

表 2 TiO₂、TiCuO-1、TiCuO-2 样品中的 Ti2p 和 Cu2p 拟合后的 Ti⁴⁺、Ti³⁺、Ti²⁺ 在 Ti2p 图谱中所占面积的百分含量及 Cu²⁺、Cu⁺ 在 Cu2p 图谱中的所占面积的百分含量
Table 2 The area percentages of Ti⁴⁺, Ti³⁺ and Ti²⁺ in the Ti2p spectra and the area percentage of Cu²⁺ and Cu⁺ in Cu2p spectra of TiO₂, TiCuO-1 and TiCuO-2 samples

Sample	Ti2p			Cu2p	
	Ti ⁴⁺	Ti ³⁺	Ti ²⁺	Cu ²⁺	Cu ⁺
TiCuO-2	47at%	53at%	0	30.2at%	69.8at%
TiCuO-1	39at%	43at%	18at%	6.2at%	93.8at%
TiO ₂	32at%	34at%	34at%	—	—

TEM 结果显示, 含 Cu 量分别为 12.4at% 和 23.1at% 的 TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品均为非晶基体中含有 Cu₂O 纳米晶粒。XRD 结果也证实了 TiCuO 薄膜存在非晶结构(图 1), 但是由于薄膜中的 Cu₂O 纳米晶粒很细小且含量少, XRD 中未观察到明显的 Cu₂O 衍射峰。XPS 结果(图 4, 表 2)也证实了 Cu₂O 是薄膜中 Cu 的主要存在形式。

2.2 TiCuO 薄膜的腐蚀和 Cu 离子释放行为

为了排除薄膜厚度对 Cu 离子释放结果的影响, 本研究选取了两种 TiCuO 薄膜的沉积时间, 以获得相近的薄膜厚度。台阶仪测量结果显示, TiCuO-1 和 TiCuO-2 薄膜的厚度分别为 190.3 nm(沉积时间 6 min) 和 192.1 nm(沉积时间 4 min)。图 5(A) 是 316L SS 和 316L SS 基体表沉积的 TiO₂、TiCuO 薄膜样品的电

位极化曲线的结果。使用 Tafel 外推法计算的样品自腐蚀电位和自腐蚀电流密度见表 3。图 5(A) 和表 3 结果显示, TiO₂ 样品的自腐蚀电流密度比 316L SS 低, 自腐蚀电位比 316L SS 高。由于材料的自腐蚀电流密度大小可以反应腐蚀的快慢^[27], 说明 TiO₂ 样品具有较高的抗腐蚀性能。故 TiO₂ 薄膜可以作为钝化层和保护层有效地提高 316L SS 材料的耐腐蚀性能。表 3 的结果还显示, 两种 TiCuO 薄膜的自腐蚀电位较低, 说明 TiCuO 薄膜与 316L SS 和 TiO₂ 薄膜相比较, 更易发生腐蚀。且 TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品的自腐蚀电流密度分别为 0.62 和 3.89 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, 均高于 316L SS 样品的自腐蚀的电流密度 0.49 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 。含 Cu 12.4at% 的 TiCuO-1 样品在 0.43 V 时产生了点蚀现象, 含 Cu 更多的 TiCuO-2 样品在更低的腐蚀电压 (0.05 V) 下也出现了点蚀现象, 并且自腐蚀电流密度突增后减少, 提示薄膜发生了腐蚀现象和薄膜的自修复效应^[28]。以上结果说明 TiCuO 样品的耐腐蚀性能高于 316L SS, 并且含 Cu 量较多的 TiCuO-2 样品更易被腐蚀。采用 SEM 和 EDS 对电化学腐蚀后 TiCuO-2 样品的表面形貌和成分分别进行了分析。

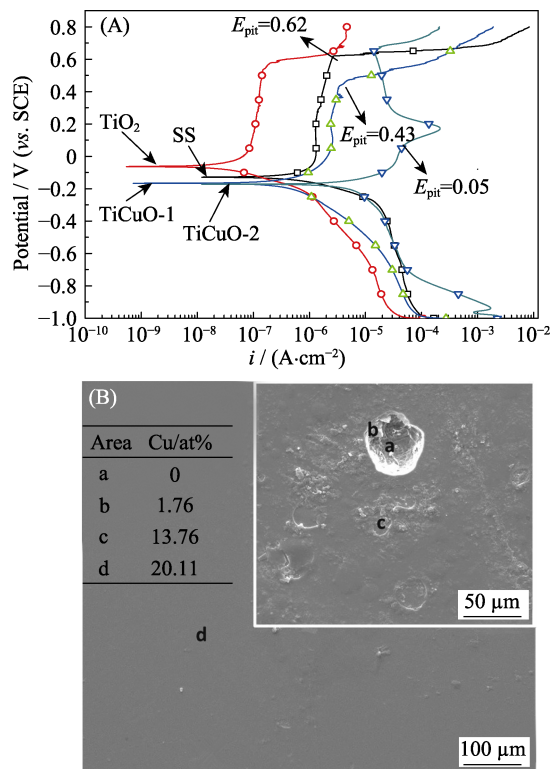


图 5 TiO₂、TiCuO 样品和 SS 的电化学腐蚀极化曲线(A) 及 TiCuO-2 样品的腐蚀形貌图和 a, b, c, d 四个不同腐蚀区域的 EDS 结果(B)

Fig. 5 Electrochemical corrosion polarization curves of TiO₂, TiCuO and 316 L SS samples (A) and morphology of the TiCuO-2 sample with its EDS results of the four different corroded areas labeled with a, b, c and d (B)

表 3 TiO_2 、 TiCuO 和 SS 的自腐蚀电位(E_{corr})及其自腐蚀电流密度(I_{corr})

Table 3 Corrosion potential (E_{corr}) and current densities (I_{corr}) of SS, TiO_2 and TiCuO films derived from potentiodynamic polarization curves

Sample	SS	TiO_2	TiCuO-1	TiCuO-2
$E_{\text{corr}}/\text{V}(\text{vs.SCE})$	-0.13	-0.06	-0.16	-0.17
$I_{\text{corr}}/(\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})$	0.49	0.03	0.62	3.89

结果显示,薄膜中大部分位置较为平整,少数地方出现了腐蚀坑(图 5(B))。材料表面腐蚀较为严重的区域(a、b、c),其 Cu 含量明显下降;而腐蚀较轻区域(d)的区域,其 Cu 的含量较大并接近于未腐蚀的样品含量。由此推测,薄膜主要从富 Cu 区发生腐蚀并释放出 Cu 离子。由 TEM 和 XPS 分析结果可知, TiCuO 样品中主要存在 Cu_2O 结构,也存在氧化钛。由于铜氧化物比氧化钛更容易被腐蚀^[29],因此薄膜中的富 Cu 区可能是薄膜开始发生腐蚀的主要区域。含 Cu 23.1at% 的 TiCuO-2 薄膜中含较多的富 Cu 区,而氧化钛钝化层含量相对更少,故更易发生腐蚀。

图 6(a)为采用 ICP-MS 方法,检测了在标准磷酸缓冲盐溶液(pH=7.4)中分别浸泡 30 min 和 1、3、5、15、30 d 后 TiCuO 薄膜累积释放的 Cu 离子浓度。结果显示,随着薄膜浸泡时间的延长, Cu 离子累积释放浓度逐渐增加。从 TiCuO 薄膜的 Cu 离子平均释放速率(图 6(b))可以看出当 TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品开始浸泡 30 min 时,薄膜中 Cu 离子的释放速率均最快,分别为 $1.66\times 10^{-4} \mu\text{mol}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ 和 $1.88\times 10^{-4} \mu\text{mol}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ 。这提示 TiCuO 薄膜浸入标准磷酸缓冲盐溶液后,在开始阶段发生了 Cu 离子的爆发性释放。在较多含 Cu 材料中均具有这种爆发性释放现象^[26,28,30]。随着浸泡时间延长, TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品中 Cu 离子平均释放速率都逐渐降低,随后 TiCuO 薄膜均表现出 30 d 稳定的 Cu 离子释放速率。在浸泡时间长达 30 d 时, TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品累积释放的 Cu 离子浓度分别约为 1.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$,含 Cu 更多的 TiCuO-2 样品累积释放 Cu 离子浓度是 TiCuO-1 样品的 3.4 倍,表明含 Cu 更多的 TiCuO 薄膜释放出了更多的 Cu 离子。薄膜的电化学腐蚀结果显示(图 5(a)),含 Cu 更多的 TiCuO 样品更容易被腐蚀,这说明 TiCuO 薄膜的 Cu 离子释放与其腐蚀行为密切相关。文献[28]显示: Cu 离子释放速率受到薄膜的厚度、薄膜的晶体结构和 Cu 含量浓度等影响。含 Cu 量为 12.4at% 的 TiCuO-1 和 23.1at% 的 TiCuO-2 样品厚度相似($\sim 200 \text{ nm}$),结构一致(非晶基体中含有少量的纳米 Cu_2O 晶粒)。较

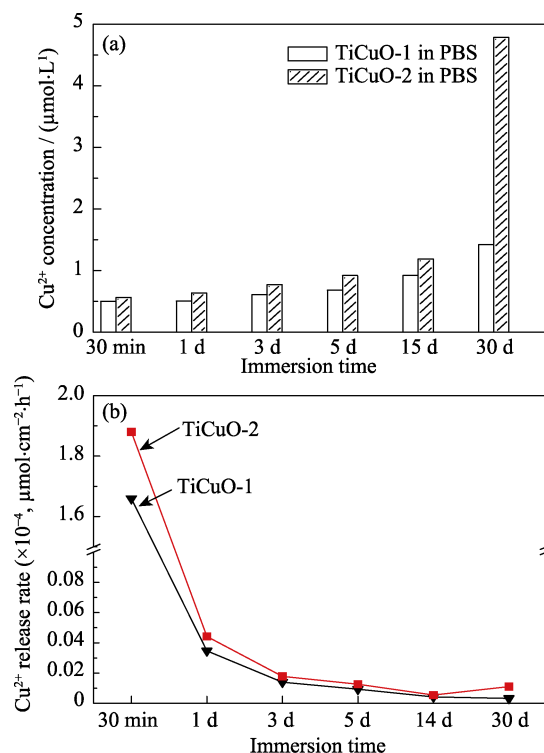


图 6 TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品释放 Cu 离子累积浓度(a)和 Cu 离子平均释放速率(b)

Fig. 6 Accumulated Cu ions concentration (a) and release rate (b) of Cu ions released from TiCuO-1 and TiCuO-2 samples

高的 Cu 含量和存在铜氧化物的富 Cu 区加剧了薄膜的腐蚀行为,从而提高了 Cu 离子释放速率。

2.3 TiCuO 薄膜表面内皮细胞相容性分析

图 7(a)是在 TiO_2 和 TiCuO 样品表面体外静态培养内皮细胞 1 和 3 d 后, CCK-8 试剂盒检测的内皮细胞活性结果。含 Cu 12.4at% 的 TiCuO-1 样品在培养内皮细胞 3 d 后,其细胞活性比 TiO_2 样品有显著增加。所有样品表面的内皮细胞形态均呈现正常的椭圆形,有正常内皮细胞典型的“铺路石”生长形态(图 7(b))。根据 ICP-MS 结果(图 6(a)), TiCuO-1 和 TiCuO-2 样品在模拟体液中浸泡 1 至 30 d 时,它们释放的 Cu 离子的累积浓度范围分别约 0.5~1.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 0.7~5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。文献报道 Cu^{2+} 和 Cu^+ 离子均能促进内皮细胞增殖^[31],并且在微摩尔浓度范围内的 Cu 离子可以促进主动脉内皮细胞的增殖和迁移^[9,31-32]。

为了进一步分析 Cu 离子对内皮细胞的影响,采用 CCK-8 试剂盒检测了含不同 CuCl_2 浓度培养液培养的内皮细胞活性,并对其进行了荧光染色。图 8(a)~(b)是不同浓度 CuCl_2 条件下培养内皮细胞 1 和 3 d 后细胞活性结果,及 3 d 时细胞的荧光显微镜下的形态。结果表明: 1~15 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 CuCl_2 溶液显著促进内皮细胞活性,当浓度大于 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时没有明显促进作用,浓度高于 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时明显抑

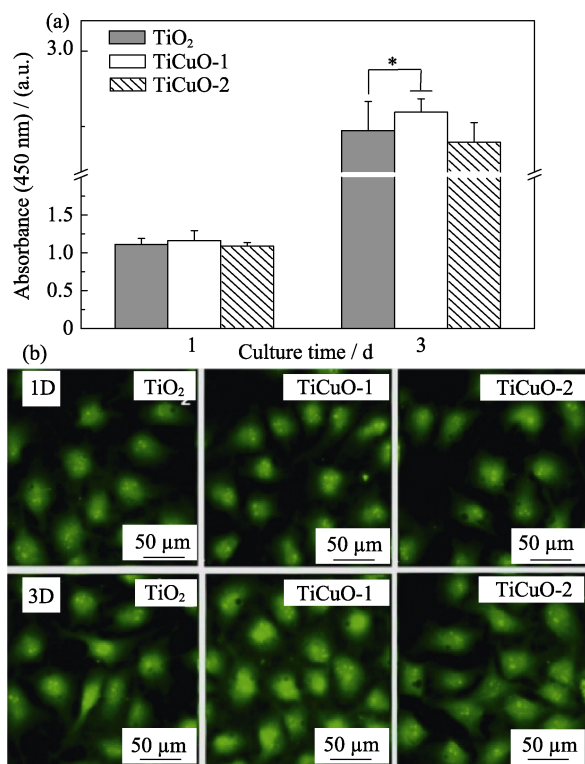


图 7 TiO₂、TiCuO 样品体外静态培养内皮细胞的细胞活性 (a) 和罗丹明荧光染色照片 (b)

Fig. 7 ECs viability detected by CCK-8 assay (a) and fluorescence microscopic images stained by rhodamine (b) after being cultured on the samples of TiO₂ and TiCuO

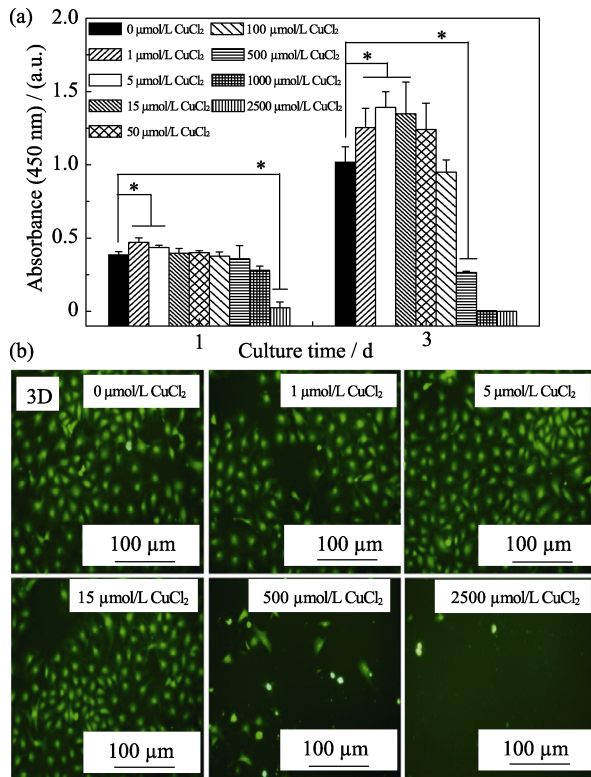


图 8 TiO₂、TiCuO 样品体外静态培养内皮细胞的细胞活性 (a) 和罗丹明荧光染色照片 (b)

Fig. 8 ECs viability detected by CCK-8 assay (a) and fluorescence microscopic images stained by rhodamine (b) after being cultured under condition medium with CuCl₂ solution at different concentration

制了内皮细胞活性, 说明 CuCl₂ 浓度明显影响了内皮细胞活性。TiCuO 薄膜表面培养 3 d 后的内皮细胞结果(图 7)显示: 与 TiO₂ 样品相比较, TiCuO-1 (12.4at% Cu) 的样品表面的内皮细胞活性显著性提高, 而含 Cu 量较高(23.1at% Cu) 的 TiCuO-2 样品表面没有显著性增加。这是因为 TiCuO-1 薄膜表面释放出一定浓度的 Cu 离子, 提高了内皮细胞活性。而含 Cu 量更高的 TiCuO-2 样品更易被腐蚀并释放出较高浓度的 Cu 离子, 没有显著提高其内皮细胞活性。文献[33]报道, 浸入细胞培养液 DMEM 中的纳米 Cu 和 CuO 颗粒所释放的 Cu 离子量比浸入在 PBS 中显著增加。因此, TiCuO 薄膜在细胞培养液中释放出的 Cu 离子浓度可能与在 PBS 中存在一定差异。但在薄膜表面与 CuCl₂ 溶液中分别培养内皮细胞的结果, 均发现 Cu 离子浓度在一定范围时可以促进内皮细胞的活性, 而浓度较高时, 则显示出抑制作用。这些结果提示, TiCuO 薄膜释放出的 Cu 离子浓度影响了内皮细胞活性。另外, TiCuO-2、TiCuO-1 和 TiO₂ 薄膜表面的水接触角分别约为(98±0.1)°、(93±0.1)°、(91±0.2)°。材料表面的润湿性能会影响内皮细胞行为^[34-35], 具有一定亲疏水平衡的表面最有利于细胞生长^[36-37]。除了释放更多的 Cu 离子外, TiCuO-2 较为疏水的表面也可能导致了内皮细胞活性没有显著性的增加。而 TiCuO-1 薄膜样品表面的润湿性等同于 TiO₂ 薄膜表面, 释放出适当浓度的 Cu 离子促进和改善了内皮细胞活性。

3 结论

采用直流磁控溅射技术成功地在 Si 片和 316 L SS 基体上沉积出 TiCuO 薄膜。TiCuO 薄膜为非晶基体, 其中含有 Cu₂O 纳米晶粒。TiCuO 薄膜中富 Cu 区引起了薄膜腐蚀, Cu 含量较高的 TiCuO 薄膜较易被腐蚀, 并能释放出较多 Cu 离子。含 Cu 量为 12.4at% 的 TiCuO 薄膜显著提高了内皮细胞体外培养状态下的细胞活性, 薄膜释放出一定浓度的 Cu 离子可以促进内皮细胞活性。TiCuO 薄膜的含 Cu 量和显微结构影响了 Cu 离子释放, 并影响了内皮细胞活性。

参考文献:

- [1] WARD M R, STEWART D J, KUTRYK M J. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 2007, **70**(7): 983-998.
- [2] NISIO D M, MIDDELDORP S, BÜLLER H R. Direct thrombin

- inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 2005, **353**(10): 1028–1040.
- [3] AKAHORI T, NIINOMI M. Fracture characteristics of fatigued Ti–6Al–4V ELI as an implant material. *Materials Science & Engineering A*, 1998, **243**(1/2): 237–243.
- [4] LENG Y X, CHEN J Y, YANG P, *et al.* Structure and properties of passivating titanium oxide films fabricated by DC plasma oxidation. *Surface & Coatings Technology*, 2003, **166**(2/3): 176–182.
- [5] TSYGANOV I A, MAITZ M F, RICHTER E, *et al.* Hemocompatibility of titanium-based coatings prepared by metal plasma immersion ion implantation and deposition. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research*, 2007, **257**(1/2): 122–127.
- [6] KLESZCZEWSKI T, MODZELEWSKA B, BAL W, *et al.* Cu(II) complexation does not affect oxytocin action on pregnant human myometrium *in vitro*. *Reproductive Toxicology*, 2015, **59**: 60–65.
- [7] AGGETT P J. An overview of the metabolism of copper. *European Journal of Medical Research*, 1999, **4**(6): 214–216.
- [8] GAETKE L M, CHOW C K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 2003, **189**(1/2): 147–163.
- [9] HU G. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1998, **69**(3): 326–335.
- [10] REN L, XU L, FENG J, *et al.* *In vitro* study of role of trace amount of Cu release from Cu-bearing stainless steel targeting for reduction of in-stent restenosis. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2012, **23**(5): 1235–1245.
- [11] SEN C K, KHANNA S, VENOJARVI M, *et al.* Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, 2002, **282**(5): H1821–H1827.
- [12] YIN R, LING L, XIANG Y, *et al.* Enhanced photocatalytic reduction of chromium (VI) by Cu-doped TiO₂ under UV-A irradiation. *Separation & Purification Technology*, 2017, **190**: 53–59.
- [13] ZONG M, LONG B, LIU Y, *et al.* Antibacterial ability and angiogenic activity of Cu-TiO₂ nanotube arrays. *Materials Science & Engineering C*, 2017, **71**: 93–99.
- [14] NORAMBUENA G A, PATEL R, KARAU M, *et al.* Antibacterial and bio compatible titanium-copper oxide coating may be a potential strategy to reduce periprosthetic infection: an *in vitro* study. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 2016, **475**(3): 1–11.
- [15] WANG H, LI Y, BA X, *et al.* TiO₂ thin films with rutile phase prepared by DC magnetron co-sputtering at room temperature: effect of Cu incorporation. *Applied Surface Science*, 2015, **345**: 49–56.
- [16] TOMOLYA K, JANOVSKY D, SYCHEVA A, *et al.* Peculiarities of ball-milling induced crystalline-amorphous transformation in Cu-Zr-Al-Ni-Ti alloys. *Intermetallics*, 2015, **65**: 117–121.
- [17] NABIALEK M. Soft magnetic and microstructural investigation in Fe-based amorphous alloy. *Journal of Alloys & Compounds*, 2015, **642**: 98–103.
- [18] OLEKSIAK RP, DEVARAJ A, HERMAN GS. Atomic-scale structural evolution of Ta-Ni-Si amorphous metal thin films. *Materials Letters*, 2016, **164**: 9–14.
- [19] TSENG I H, WU J C S, CHOU H Y. Effects of Sol-Gel procedures on the photocatalysis of Cu/TiO₂ in CO₂ photoreduction. *Journal of Catalysis*, 2004, **221**(2): 432–440.
- [20] SUN C, ZHU J, LV Y, *et al.* Dispersion, reduction and catalytic performance of CuO supported on ZrO₂-doped TiO₂ for NO removal by CO. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2011, **103**(1): 206–220.
- [21] LIU J, LI X, ZHAO Q, *et al.* The selective catalytic reduction of NO with propene over Cu-supported Ti-Ce mixed oxide catalysts: promotional effect of ceria. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2013, **378**: 115–123.
- [22] LONG R, ENGLISH N J. Electronic properties of anatase-TiO₂, co-doped by cation-pairs from hybrid density functional theory calculations. *Chemical Physics Letters*, 2011, **513**(4): 218–223.
- [23] NAKAYAMA S, KIMURA A, SHIBATA M, *et al.* Voltammetric characterization of oxide films formed on copper in air. *Journal of the Electrochemical Society*, 2001, **148**(11): B467–B472.
- [24] NAKAYAMA S, NOTOYA T, OSAKAI T. Highly selective determination of copper corrosion products by voltammetric reduction in a strongly alkaline electrolyte. *Analytical Sciences the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 2012, **28**(4): 323.
- [25] BELOUSOV V V. Mechanisms of accelerated oxidation of copper in the presence of molten oxides. *Oxidation of Metals*, 2007, **67**(5/6): 235–250.
- [26] AL-MAYOUF A M, AL-SWAYIH A A, AL-MOBARAK N A, *et al.* Corrosion behavior of a new titanium alloy for dental implant applications in fluoride media. *Materials Chemistry and Physics*, 2004, **86**(2/3): 320–329.
- [27] LIU H, LENG Y, HUANG N. Corrosion resistance of Ti-O film modified 316L stainless steel coronary stents *in vitro*. *Journal of Materials Engineering & Performance*, 2012, **21**(3): 424–428.
- [28] LIU H, ZHANG D, FENG S, *et al.* Corrosion and ion release behavior of Cu/Ti film prepared via physical vapor deposition *in vitro* as potential biomaterials for cardiovascular devices. *Applied Surface Science*, 2012, **258**(19): 7286–7291.
- [29] JACEK BANAS, ANDRZEJ MAZURKIEWICZ. The effect of copper on passivity and corrosion behaviour of ferritic and ferritic-austenitic stainless steels. *Materials Science and Engineering: A*, 2000, **277**(1/2): 183–191.
- [30] STRANAK V, WULFF H, REBL H, *et al.* Deposition of thin titanium copper films with antimicrobial effect by advanced magnetron sputtering methods. *Materials Science & Engineering C*, 2011, **31**(7): 1512–1519.
- [31] SEO Y, CHO Y S, HUH Y D, *et al.* Copper ion from Cu₂O crystal induces AMPK-mediated autophagy via superoxide in endothelial cells. *Molecules & Cells*, 2016, **39**(3): 195–203.
- [32] LIU H, PAN C, ZHOU S, *et al.* Improving hemocompatibility and accelerating endothelialization of vascular stents by a copper-titanium film. *Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications*, 2016, **69**: 1175–1182.
- [33] MIDANDER K, CRONHOLM P, KARLSSON H L, *et al.* Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small*, 2009, **5**(3): 389–399.
- [34] ARIMA Y, IWATA H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 2007, **28**(20): 3074–3082.
- [35] ESHAGHI A, ESHAGHI A. Preparation and hydrophilicity of TiO₂ Sol-Gel derived nanocomposite films modified with copper loaded TiO₂ nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 2011, **46**(12): 2342–2345.
- [36] HUANG L, NING C Q, DING D Y, *et al.* Wettability and *in vitro* bioactivity of doped TiO₂ nanotubes. *Journal of Inorganic Materials*, 2010, **25**(7): 775–779.
- [37] BRAMMER K S, OH S, GALLAGHER J O, *et al.* Enhanced cellular mobility guided by TiO₂ nanotube surfaces. *Nano Letters*, 2008, **8**(3): 786–793.