

## 钽离子注入对镍钛合金表面生物学性能的影响

吴 凌<sup>1,2</sup>, 谭 继<sup>1</sup>, 钱 仕<sup>1,3</sup>, 葛乃建<sup>4</sup>, 刘宣勇<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷与超微结构国家重点实验室, 上海 200050; 2. 中国科学院大学材料科学与光电工程中心, 北京 100049; 3. 慈溪生物材料表面工程中心, 宁波 315300; 4. 海军军医大学 东方肝胆外科医院, 上海 200438)

**摘 要:** 镍钛合金血管支架植入后可引发血栓和支架再狭窄, 且对损伤的血管内壁无修复作用, 需进行表面改性赋予其抗凝血和促内皮化生物学功能。本研究采用等离子体浸没离子注入与沉积(PIII&D)技术将钽(Ta)注入至镍钛合金, 研究 Ta 离子注入对镍钛表面理化特性及生物学性能的影响规律。结果表明, 调控 Ta 离子注入时间, 可在镍钛表面分别构建含 Ta、Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 三种不同组分的改性层。各种改性样品中, 含 Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的改性镍钛表面亲水性均更好, 可提供更多细胞附着位点, 促进人脐静脉内皮细胞早期粘附和铺展, 并提高其增殖能力。相比仅含单质 Ta 的改性镍钛表面, 含 Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 改性镍钛表面的血液相容性更高, 血小板粘附数量显著减少, 且基本保持为未被激活的球形状态; 各组改性表面的溶血率远低于 5% 阈值, 均未发生明显溶血现象。上述结果说明, Ta 离子注入改性镍钛血管支架在降低血栓形成、加速内皮化方面具有潜在应用。

**关 键 词:** 镍钛合金; 钽; 离子注入; 血液相容性

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

## Biological Property Investigation of Nitinol Surface Implanted with Tantalum

WU Ling<sup>1,2</sup>, TAN Ji<sup>1</sup>, QIAN Shi<sup>1,3</sup>, GE Naijian<sup>4</sup>, LIU Xuanyong<sup>1,2,3</sup>

(1. State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructure, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 2. Center of Materials Science and Optoelectronics Engineering, University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; 3. Cixi Center of Biomaterials Surface Engineering, Ningbo 315300, China; 4. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200438, China)

**Abstract:** Nitinol vascular stent can trigger thrombosis and restenosis, but lacks the ability to rehabilitate with injury still to the blood vessel wall. Thus, surface modification to the stent is indispensable for nitinol surfaces to realize biological functions of anticoagulation and accelerate endothelialization. Here, tantalum ions were implanted into nitinol surfaces by plasma immersion ion implantation and deposition (PIII&D). Physicochemical and biological characteristics of the modified nitinol surfaces were analyzed. The results show that the Ta, Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, and Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-containing modified layers are formed on nitinol surfaces with extension of implantation time. Among all samples, the modified surface containing Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> phase possesses better hydrophilicity and

收稿日期: 2022-03-13; 收到修改稿日期: 2022-04-18; 网络出版日期: 2022-05-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31971249); 上海市基础研究重点项目(19JC1415500); 宁波市高层次人才和高端创新创业团队引进计划(2018A-09-C)

National Natural Science Foundation of China (31971249); The Key Project of Fundamental Research of Shanghai (19JC1415500); High-level Talents and Innovative and High-end Entrepreneur Team Introduction Plan of Ningbo (2018A-09-C)

作者简介: 吴 凌(1997-), 男, 硕士研究生. E-mail: 18373153250@163.com

WU Ling (1997-), male, Master candidate. E-mail: 18373153250@163.com

通信作者: 刘宣勇, 研究员. E-mail: xyliu@mail.sic.ac.cn

LIU Xuanyong, professor. E-mail: xyliu@mail.sic.ac.cn

provides more sites for cell attachment to promote initial cell adhesion and proliferation. Compared with the solely Ta-bearing surface, the modified surface containing Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> shows superior hemocompatibility, on which fewer adhered platelets are observed, maintaining an inactive and original spherical shape. Besides, the hemolysis rates of all samples are far below the threshold value of 5%, indicating that hemolysis hardly happens. The results indicate that Ta ion implantation modified nitinol stent has a potential application in reducing thrombosis and accelerating endothelialization.

**Key words:** nitinol; tantalum; ion implantation; hemocompatibility

冠心病是最典型的心血管疾病之一,《中国心血管健康与疾病报告 2020》推算 2020 年中国冠心病患者人数就达到 1139 万<sup>[1]</sup>。血管支架介入治疗是有效治疗冠心病的主要方法,具有手术效果明显、创伤小、恢复快等优点。镍钛合金是一种镍、钛原子比相近的金属间化合物,具有超弹性、形状记忆能力、耐腐蚀性强和生物相容性好等特点,是制作自膨胀型血管支架的常用材料。然而,镍钛血管支架植入血管之后,其表面与血液接触常引发凝血级联反应,导致纤维蛋白沉积、血小板激活和血栓形成<sup>[2]</sup>。此外,支架在植入过程中会对血管内皮造成损伤,造成损伤部位分泌凝血因子,引起血小板和纤维蛋白迅速沉积,诱发血管内膜增生,促进血栓形成和血管再狭窄发生<sup>[3]</sup>。但生物惰性的镍钛表面对血管内壁损伤不具备修复作用。因此,有必要对镍钛合金表面作表面改性,以提高其血液相容性并赋予其内皮修复功能,相关研究已成为当前的研究重点<sup>[4-5]</sup>。

支架植入体内后,材料表面的粗糙度、湿润性、化学成分等因素直接影响血栓形成和血管内皮细胞状态。通过表面改性可调控镍钛表面的各类理化性质,赋予其生物学功能<sup>[6-8]</sup>。研究表明,相比于平坦表面,具有一定纳米结构的表面更利于细胞粘附、迁移和增殖<sup>[9-10]</sup>。镍钛合金经碱溶液腐蚀后表面形成均匀分布的纳米片结构,可促进内皮细胞粘附、增殖,上调血管内皮生长因子表达,促进血管新生<sup>[11]</sup>。支架一旦与血液接触,其中的蛋白质在数秒内吸附到材料表面,所吸附的蛋白质种类、含量影响了后续的凝血反应。一般认为亲水表面阻碍蛋白质吸附,有利于提高材料表面的血液相容性。将高亲水性的聚乙烯基-2-吡咯烷酮(PVP)枝接到镍钛表面,接触角从 72°降低到 20°,血浆蛋白吸附量降低 22%<sup>[12]</sup>。在镍钛表面构建水凝胶涂层后亦可将接触角进一步降至接近 0°,实现超亲水性能,同时将弹性模量和硬度分别从 97.1 和 5.1 GPa 降至 2.3 和 0.13 GPa,更为“柔软”的表面可减少植入体对血管等软组织的机械刺激<sup>[13]</sup>。肝素是一种天然抗凝剂,具有抗凝血和

抑制内膜增生的作用<sup>[14]</sup>,其本身是一种带负电荷的线性多糖,可通过电荷吸附或共价枝接在镍钛表面制备含肝素涂层,降低溶血率,减少血小板粘附量,并促进内皮细胞增殖<sup>[15-16]</sup>。这些研究均在一定程度上改善了镍钛合金的血液相容性,对镍钛合金血管支架的临床应用起到重要作用。但这些表面改性方法所制备的涂层与基体结合力不够牢固,支架膨胀伸展后仍可能脱落,共价枝接的有机分子反应活性易受外界环境影响,且在生理环境中可能突然释放进而导致炎症<sup>[17]</sup>。因此,急需探索一种更加稳定有效的表面改性方法,以提高镍钛合金的生物学性能。

等离子体浸没离子注入与沉积(Plasma Immersion Ion Implantation and Deposition, PIII&D)技术是一种原位表面改性技术,正离子在脉冲负高压电场作用下均匀、全方位地注入到材料表面,能构建出具有生物学功能的改性表面。Ta 具有优良的生物相容性和化学稳定性,其离子被注入到高分子材料表面后,能有效改善其疏水性质和生物惰性,抑制纤维包膜形成,利于内皮细胞粘附、增殖,赋予其抗血栓性能<sup>[18-20]</sup>。鉴于此,本研究采用 PIII&D 技术将 Ta 离子注入至镍钛合金表面,研究 Ta 离子注入对镍钛表面理化性质的影响,评价内皮细胞在改性表面的粘附、增殖等生物学行为及其血液相容性,获得可应用于血管支架的兼具抗凝血、促内皮功能的镍钛表面,从而提高相关支架的疗效和安全性。

## 1 实验方法

### 1.1 样品制备

将尺寸为  $\Phi 12\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  的镍钛圆片在超声条件下依次用混酸(HF、HNO<sub>3</sub>)、去离子水、超纯水清洗,晾干,作为对照组,记为 NiTi。将样品放入离子注入设备反应室后,抽真空至  $5 \times 10^{-3}\text{ Pa}$ ,阴极离子注入源为高纯金属 Ta,辅助离化气体为纯氩气,按照表 1 参数采用 PIII&D 技术将 Ta 离子注入到材料

表 1 钽等离子体浸没离子注入与沉积工艺参数  
Table 1 Process parameters of tantalum plasma immersion ion implantation and deposition

| Parameter                             | Target      | Cathodic arc |
|---------------------------------------|-------------|--------------|
| Voltage pulse duration/ $\mu\text{s}$ | 500         | 800          |
| Pulsing frequency/Hz                  | 10          | 10           |
| Implantation voltage/kV               | -15         | -            |
| Implantation time/min                 | 30, 60, 120 | -            |

表面, 其中 30Ta-NiTi、60Ta-NiTi、120Ta-NiTi 分别表示 Ta 离子注入 30、60 和 120 min 的样品。

1.2 表面形貌与成分表征

采用场发射扫描电子显微镜(FE-SEM; SU9000, 日本)在不同倍数下观察样品表面形貌; 采用 X 射线衍射仪(XRD; D/Max, Rigaku, 日本)表征样品表面晶体结构; 采用 X 射线光电子能谱(XPS; AXIS Supra, 英国)分析样品表面元素组分与化学价态。

1.3 表面湿润性表征

采用视频接触角仪(SL200B, Solon, China)表征样品表面亲水性。将 2  $\mu\text{L}$  超纯水垂直滴到样品表面, 液滴稳定后通过接触角测试仪及相关软件测量并得出液滴接触角。

1.4 耐腐蚀性能表征

通过极化曲线分析样品表面耐腐蚀性能。采用三电极电化学工作站(CHI760C, 上海辰华仪器有限公司)测量样品极化曲线, 电解液为 0.9%氯化钠溶液, 样品作为工作电极, 氯化银电极为参比电极, 碳电极为对电极。开路电压稳定 400 s 后进行测试, 工作电压范围是-1~1 V, 扫描速率为 10 mV/s, 扫描步长为 1 mV。

1.5 细胞行为评价

1.5.1 细胞培养

将样品用 75%乙醇溶液杀菌, 晾干待用。人脐静脉内皮细胞(HUVECs, Cell Bank, 中国科学院)以  $10^4$  cell/mL 的密度接种在灭菌样品表面, 每个样品滴加 1 mL 细胞悬浮液, 所有细胞在无菌细胞培养箱中培养一定时间。

1.5.2 细胞黏附

细胞培养到 1、4、24 h 时, 移去原培养基, 用磷酸缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)缓冲液润洗后, 再用 4%多聚甲醛(PFA, Sigma, 美国)固定, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。再 PBS 润洗后加入 0.1% Triton X-100 (Amresco, 美国)通透细胞膜, 以 1%的牛血清蛋白(BSA, Sigma, 美国)封闭细胞, 再次润洗后分别用荧光剂 FITC 标记的鬼笔环肽(Sigma, 美国)、

4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, Invitrogen, 美国)分别染色细胞骨架、细胞核, 在激光共聚焦显微镜(TCS SP8, 德国)下观察不同时期细胞的黏附形态。

1.5.3 活/死细胞染色

培养 4 d 后, 移去原培养液, 用 PBS 润洗两遍。采用活/死细胞染色试剂盒(BioVision, 美国)评价样品表面的细胞毒性, 遵照试剂盒使用要求将 PBS 稀释的染色液加入到样品表面, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min, 再次用 PBS 缓冲液润洗三遍, 通过荧光显微镜观察活/死染色结果。

1.5.4 细胞增殖

细胞分别培养到 1、4、7 d 时, 润洗后加入含 10%阿尔玛蓝(AlamarBlueTM, AbD serotec Ltd, 英国)的新鲜培养基, 在细胞培养箱中孵育 2 h, 摇匀后吸取 100  $\mu\text{L}$  培养液加入到 96 孔板, 利用酶标仪(Synergy H4, Bio-Tek, 美国)检测其荧光强度。

1.6 血液相容性评价

1.6.1 溶血率

由志愿者提供新鲜健康的人体全血, 血液采集和使用经海军军医大学医学研究伦理委员会批准。样品置于 24 孔板中, 每孔加入 1.5 mL 0.9%氯化钠溶液, 在空白孔内分别加入等量 0.9%氯化钠溶液、超纯水分别作为阴性对照组和阳性对照组, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱内保温 30 min。每孔加入 30  $\mu\text{L}$  健康新鲜的人体全血, 摇匀后继续保温 1 h。取孔板浸提液进行离心, 3000 r/min 离心 5 min, 取 100  $\mu\text{L}$  上清液加入到 96 孔板, 通过酶标仪在 545 nm 波长处测量其吸光度。根据以下公式计算溶血率:

Hemolysis rate (%) =

$$\frac{\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{negative control}}}{\text{OD}_{\text{positive control}} - \text{OD}_{\text{negative control}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.6.2 血小板黏附形态

将人体全血在 1500 r/min 下离心 15 min, 吸取中层淡黄色的富血小板血浆, 每个样品表面滴加 60  $\mu\text{L}$ , 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱内保温 30 min, 加入 2.5%戊二醛(国药集团, 上海)溶液固定, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。用梯度浓度的乙醇/水、乙醇/六甲基硅二胺溶液脱水, 在扫描电子显微镜下观察血小板黏附形态。

1.7 数据统计分析

利用分析软件 GraphPad Prism 进行数据统计分析。通过一维方差分析评价各组实验变量之间是否存在显著性差异, 每组变量至少包含 3 个有效数据。设定显著性差异水平  $p < 0.05$  记为“\*”;  $p < 0.01$  记为“\*\*”;  $p < 0.001$  记为“\*\*\*”。

## 2 结果与讨论

### 2.1 表面理化性质

NiTi、30Ta-NiTi、60Ta-NiTi、120Ta-NiTi 样品的表面形貌如图 1 所示。在低倍下, 酸洗后的 NiTi 样品表面存在机械加工残余的金属颗粒, 注入 Ta 离子, 表面颗粒物明显减少, 可能由于 Ta 离子的高能轰击所致。在高倍 SEM 下观察到 30Ta-NiTi、60Ta-NiTi 样品表面经 Ta 离子轰击后更加平整, 延长注入时间, 更多的 Ta 离子在注入过程中沉积到材料表面, 致使 120Ta-NiTi 样品表面更加粗糙。

XRD 图谱显示各组样品表面晶体结构均相同, 衍射峰均归结于 NiTi 和  $\text{Ni}_3\text{Ti}$  相(图 2)。由于 Ta 离子注入量很少, 改性表面较薄, 因此未检测到 Ta 相关物质的晶相。但 Ta 离子注入镍钛表面与  $\text{Ni}_3\text{Ti}$  晶相对应的衍射峰增强。

在 Ni-Ti 相图中, NiTi、 $\text{Ni}_3\text{Ti}$  相是镍钛合金的稳定化合物, 镍原子和钛原子遵循以下热力学公式形成 NiTi、 $\text{Ni}_3\text{Ti}$  相<sup>[21]</sup>:

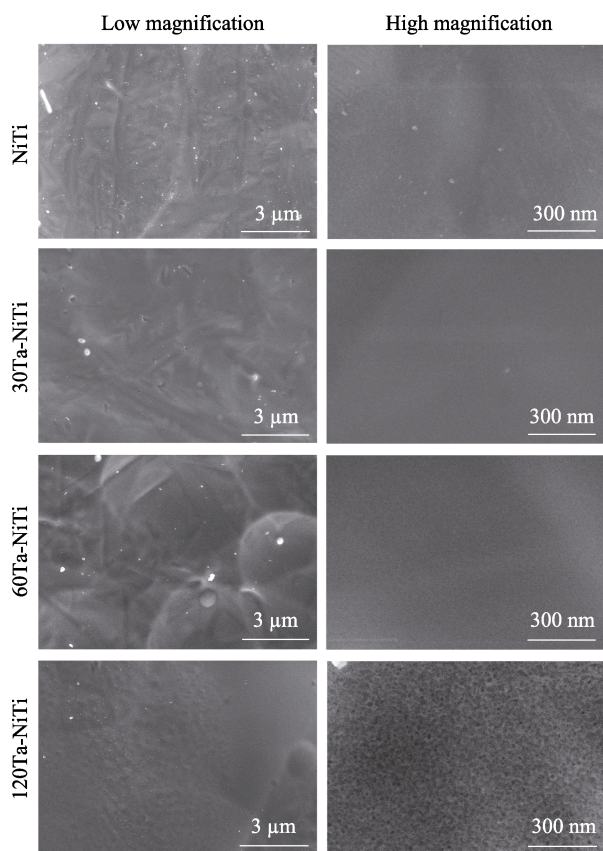
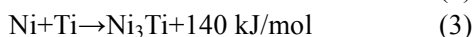


图 1 样品表面形貌的 SEM 照片

Fig. 1 SEM images of surface morphologies of different samples

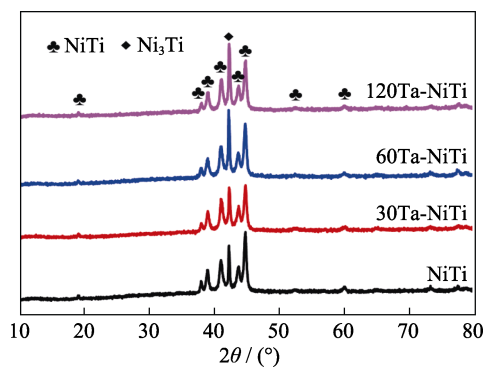


图 2 样品的 XRD 图谱

Fig. 2 XRD patterns of different samples

从公式中可以看出, 镍钛表面受热后倾向于形成更具热力学稳定性的  $\text{Ni}_3\text{Ti}$  相。因此, 离子注入过程中产生的热效应诱导镍钛表面晶体结构转变为  $\text{Ni}_3\text{Ti}$  相<sup>[22]</sup>, 相应的衍射峰增强。

XPS 全谱结果(图 3(a))表明, Ta 离子成功注入至镍钛表面, 30Ta-NiTi、60Ta-NiTi、120Ta-NiTi 样品的表面 Ta 原子含量分别为 0.67%、1.72%、和 6.45%。改性镍钛表面 Ta 元素 XPS 高分辨图谱显示, 30Ta-NiTi、60Ta-NiTi、120Ta-NiTi 样品的 Ta4f 高分辨峰存在明显差别(图 3(b~d))。30Ta-NiTi 样品仅存在位于 22.37 eV 的 Ta4f<sub>7/2</sub> 特征峰, 对应于单质 Ta<sup>[23]</sup>。而 60Ta-NiTi 样品还存在位于 26.05 eV (Ta4f<sub>7/2</sub>)和 27.94 eV (Ta4f<sub>5/2</sub>)的特征峰<sup>[24]</sup>, 对应于 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>。除 Ta 和 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 对应的特征峰, 120Ta-NiTi 样品还存在位于 24.35 eV 的 Ta4f<sub>7/2</sub> 特征峰, 对应于 Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub><sup>[25]</sup>。注入时间为 30 min, Ta 离子主要嵌入至镍钛表层, 以单质 Ta 形式存在; 注入时间延长至 60 min, 镍钛表面改性层的 Ta 含量过饱和并析出, 被反应腔内残余的氧气氧化形成 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 注入时间延长至 120 min, 改性镍钛表面 Ta 的析出量进一步增大, 腔体残余的氧气难以将镍钛表面的单质 Ta 完全氧化, 故形成含氧空位的 Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>。上述结果表明, 通过调控注入时间, 构建得到了含 Ta、Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 三种不同组分的改性镍钛表面。

材料表面湿润性会影响蛋白质粘附和细胞生长行为。各组样品的接触角如图 4 所示, 酸洗镍钛和 30Ta-NiTi 样品的接触角分别为 75.82°和 64.37°, 说明注入 Ta 离子可增强镍钛表面亲水性, 这可能是离子注入活化了镍钛表面导致。60Ta-NiTi 样品接触角减小至 60.18°, 因其表面存在 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Ta-O 键可通过水合作用形成 Ta-OH 基团, 更利于水分子吸附。120Ta-NiTi 样品接触角进一步减小至 45.67°, 这是由于样品表面存在氧空位, 水分子吸附在氧空位处并发生解离, 生成羟基<sup>[26]</sup>, 使其亲水性增强。

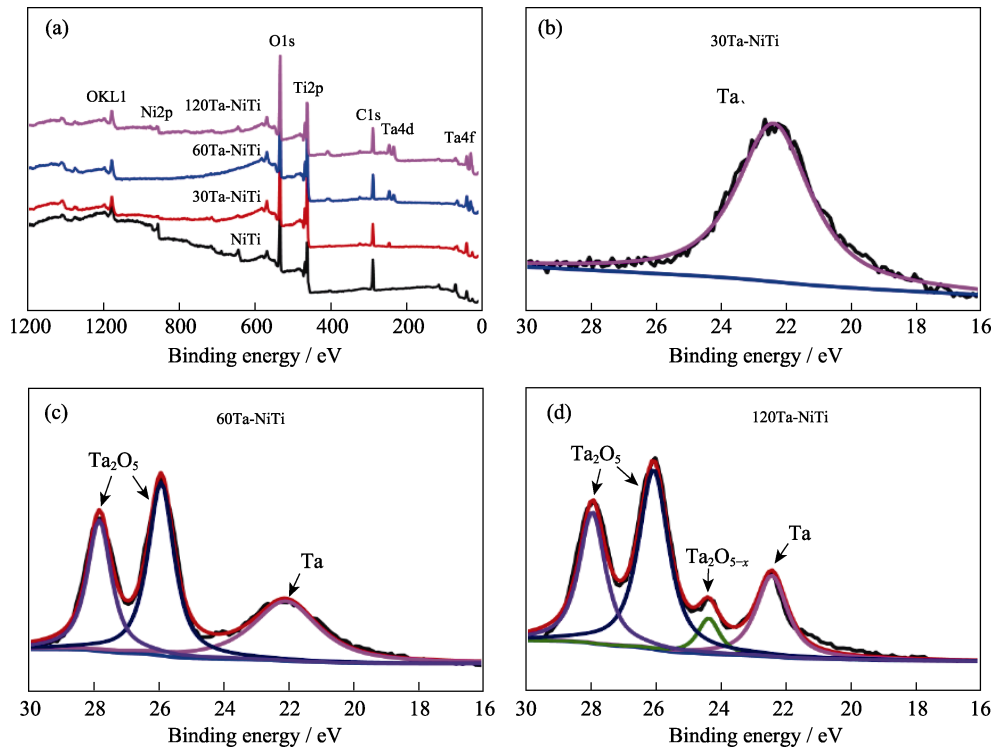


图 3 (a)样品表面的 XPS 全谱和(b~d)Ta4f 高分辨图谱  
Fig. 3 (a) XPS full spectra and (b-d) Ta4f high-resolution XPS spectra detected from samples' surfaces  
The color figures can be obtained from online edition

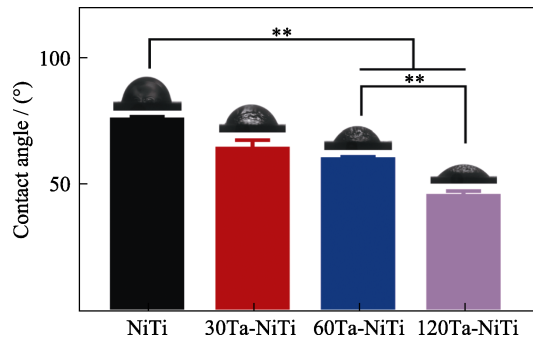


图 4 样品的接触角  
Fig. 4 Contact angles of various samples  
The color figures can be obtained from online edition (\*\*:  $p<0.01$ )

生理环境包含  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{OH}^-$  等腐蚀性离子, 植入体可能会被腐蚀导致炎症发生。为评价材料的耐腐蚀性, 在生理盐水中测试样品的极化曲线, 对应的测试结果如图 5 和表 2 所示。Ta 离子注入前后样品的腐蚀电流没有明显差异, 但腐蚀电位随注入时间延长逐渐增大, 表明 Ta 离子注入后镍钛表面的耐腐蚀性得到增强。合金的标准电极电位介于各组分之间, 故可通过添加具有更高电位的金属组分提高其电极电位<sup>[27]</sup>。金属 Ta 的标准电极电位为  $-0.75\text{ eV}$ , 大于 Ti 的  $-1.63\text{ eV}$ <sup>[28]</sup>, 因此 Ta 离子注入镍钛表面的腐蚀电位提高, 耐腐蚀性增强。

2.2 细胞相容性

细胞在各组样品表面的初期粘附行为如图 6 所

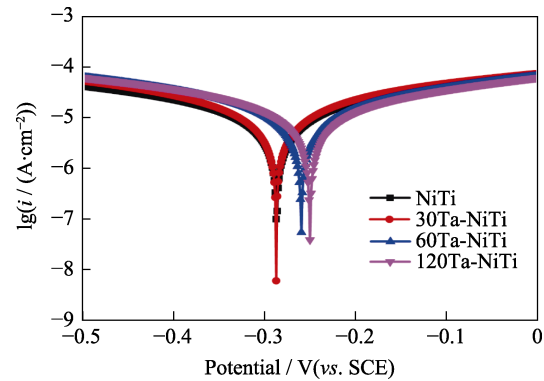


图 5 样品在生理盐水中的极化曲线  
Fig. 5 Polarization curves of various samples in physiological saline.  
The color figure can be obtained from online edition

表 2 样品的腐蚀电位与腐蚀电流  
Table 2 Corrosion potentials and corrosion currents of various samples

| Sample     | $E_{\text{corr}}/\text{V}$ | $I_{\text{corr}}/(\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})$ |
|------------|----------------------------|-------------------------------------------------|
| NiTi       | -0.288                     | $5.65\times10^{-6}$                             |
| 30Ta-NiTi  | -0.288                     | $6.37\times10^{-6}$                             |
| 60Ta-NiTi  | -0.261                     | $6.69\times10^{-6}$                             |
| 120Ta-NiTi | -0.251                     | $6.62\times10^{-6}$                             |

示。培养 1 h 后, 细胞开始粘附到材料表面, 呈圆球状, 各组样品的粘附形态没有显著差异, 表明 Ta 离子注入未产生不良反应。培养时间延长到 4 h, 细胞

向周围铺展, 形状转变为多边形。培养 24 h, 细胞内皮化, 形态转变为更加狭长的形状。特别在 Ta 离子注入改性镍钛表面上, 细胞伸出更多丝状伪足, 铺展面积更大, 表明 Ta 离子注入改性可促进细胞粘附铺展, 这可能与 Ta 优良的细胞相容性以及改性表面更好的亲水性有关。

选用 HUVECs 评价各组样品表面的细胞毒性, 其活死细胞染色结果(图 7)显示, 培养 4 d 后细胞在 NiTi 样品表面生长良好, 未发现明显死细胞, 30Ta-NiTi、60Ta-NiTi、120Ta-NiTi 样品呈现类似的细胞染色结果, 表明 Ta 离子注入改性表面具有良好的化学稳定性, 无细胞毒性。

细胞在材料表面培养不同时间的增殖活性如图 8 所示。培养 1 d 后, 各组样品表面细胞的增殖活性没有显著差异。延长培养时间到 4 d 时, Ta 离子注

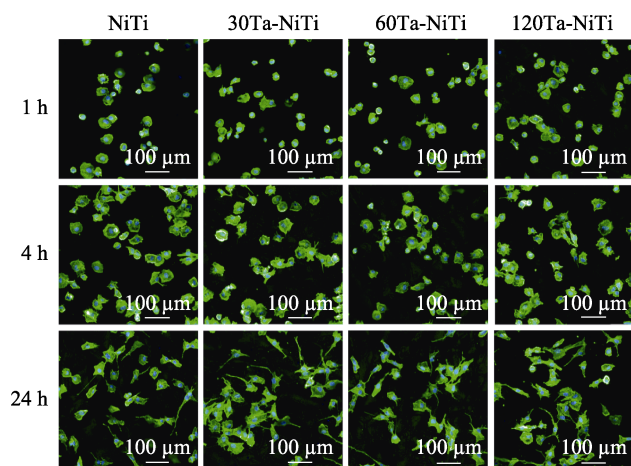


图 6 HUVECs 在样品表面培养 1、4、24 h 的荧光照片  
Fig. 6 Fluorescent images of HUVECs adhered to various samples at 1, 4, and 24 h

The color figures can be obtained from online edition

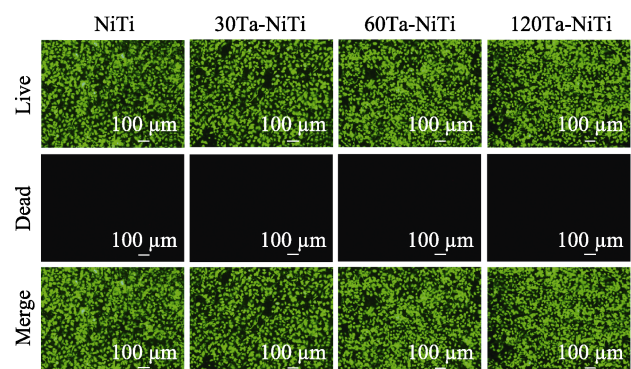


图 7 样品表面培养 4 d 的 HUVECs 的活/死细胞染色荧光图像  
Fig. 7 Live (green)/dead (red) cell staining fluorescent images of HUVECs seeded on samples for 4 d

The color figures can be obtained from online edition

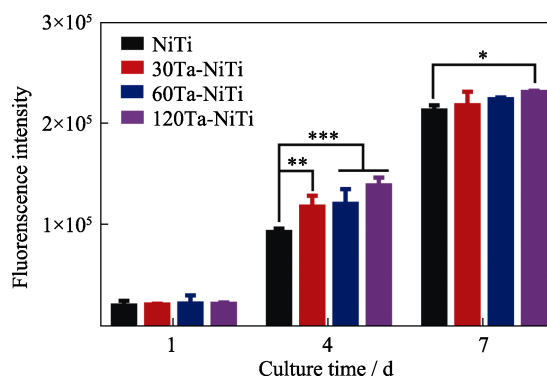


图 8 HUVECs 在样品表面培养 1、4、7 d 的细胞活性  
Fig. 8 Cell viability of HUVECs cultured on sample surfaces for 1, 4 and 7 d

The color figures can be obtained from online edition

\*:  $p < 0.05$ , \*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

入改性表面促进细胞增殖, 细胞活性与注入时间呈正相关, 120Ta-NiTi 样品表面细胞活性最高。培养 7 d 时, 120Ta-NiTi 样品表面细胞增殖活性略高于 NiTi 样品。体外细胞实验表明 Ta 离子注入改性可提高镍钛合金表面细胞相容性, 促进细胞初期粘附和铺展, 同时对细胞增殖活性也有积极作用。

### 2.3 血液相容性

血管支架植入体与血液接触时, 可能引发血小板激活和红细胞破损, 导致血管再狭窄发生。因此血液接触性材料必须具有良好的血液相容性<sup>[29-30]</sup>。

血小板在样品表面培养 30 min 后, 其粘附形态如图 9(a)所示。在 NiTi 样品表面存在许多不同状态的血小板, 黑色箭头标示的血小板被严重激活, 细胞形状皱缩变形, 伸出丝状伪足, 有形成血栓的可能。30Ta-NiTi 样品表面血小板数量减少, 且激活程度减轻, 细胞形状轻微变形; 而 60Ta-NiTi 和 120Ta-NiTi 样品表面血小板粘附数量显著少于 NiTi 样品, 细胞形态基本呈未激活的球形。在生理溶液中, 红细胞、血小板等血液成分与含 Ta 表面均带负电荷, 二者互相排斥, 减少血液组分的粘附, 因此 Ta 离子注入改性的镍钛表面血液相容性更佳。此外, Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 属于 n 型半导体, 其带隙宽度约为 4.2 eV。具有类似本征半导体结构的纤维蛋白原与 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 接触后, 由于二者能带差异形成电子跃迁“势垒”, 阻碍蛋白质与 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 间的电子转移, 抑制蛋白质变性, 因此含有 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的 60Ta-NiTi 和 120Ta-NiTi 样品表面更利于降低血栓形成<sup>[31]</sup>。溶血率测试结果如图 9(b)所示, 各组样品的溶血率均不超过 0.49%, 远低于 5% 的临床要求, 表明改性前后样品均未发生明显的溶血现象。

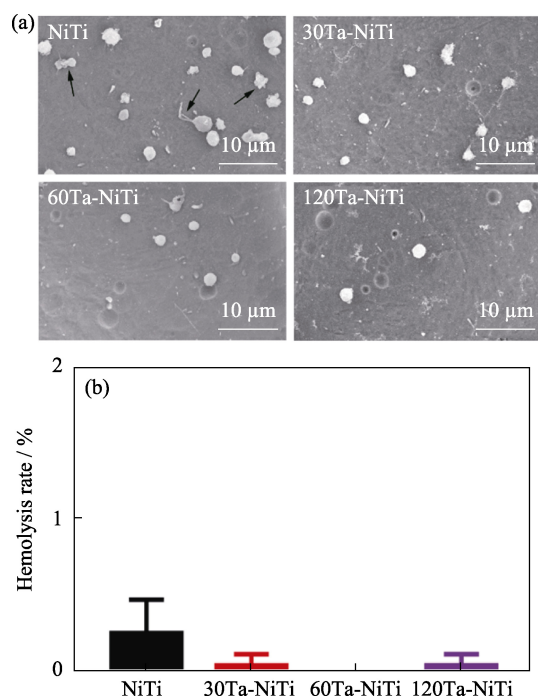


图 9 (a)样品表面的血小板粘附 SEM 照片和(b)各组样品的溶血率

Fig. 9 (a) SEM images of adhered platelets on sample surfaces and (b) hemolysis rate of various samples

Arrows indicate the stimulated platelets; The color figures can be obtained from online edition

### 3 结论

本研究采用等离子体浸没离子注入与沉积技术将 Ta 离子注入至镍钛合金表面, 通过调控注入时间分别构建了含有 Ta、Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 三种不同组分的改性镍钛表面。随着注入时间延长, 改性镍钛表面的亲水性增加, 耐腐蚀性得到增强。体外细胞实验表明, Ta 离子注入改性表面无细胞毒性, 对人脐静脉内皮细胞早期粘附和铺展行为有促进作用, 并能提高细胞增殖活性, 加速细胞内皮化。血液相容性实验表明 Ta 离子注入可提高镍钛表面血液相容性, 含 Ta/Ta<sub>2</sub>O<sub>5-x</sub>/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的样品表面血小板粘附数量明显减少, 形态基本保持未被激活的球形, 可降低血栓形成的可能性。Ta 离子注入改性镍钛合金具有良好血液相容性, 且有望加快细胞内皮化, 具有一定的应用前景。

### 参考文献:

[1] The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases burden in China: an updated summary of 2020. *Chinese Circulation Journal*, 2021, **36**(6): 582–590.

[2] BRASH J L, HORBETT T A, LATOUR R A, *et al.* The blood compatibility challenge. Part 2: protein adsorption phenomena

governing blood reactivity. *Acta Biomaterialia*, 2019, **94**: 11–24.

[3] JIANG L, YAO H, LUO X, *et al.* Copper-mediated synergistic catalytic titanium dioxide nanofilm with nitric oxide generation and anti-protein fouling for enhanced hemocompatibility and inflammatory modulation. *Applied Materials Today*, 2020, **20**: 100663–12.

[4] SUROVTSEVA M A, POVESCHENKO O V, KUZMIN O S, *et al.* Titanium oxide- and oxynitride-coated nitinol: effects of surface structure and composition on interactions with endothelial cells. *Applied Surface Science*, 2022, **578**: 152059–14.

[5] ZHAO Y, WANG Z, BAI L, *et al.* Regulation of endothelial functionality through direct and immunomodulatory effects by Ni-Ti-O nanospindles on NiTi alloy. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2021, **123**: 112007–10.

[6] COCKERILL I, SEE C W, YOUNG M L, *et al.* Designing better cardiovascular stent materials: a learning curve. *Advanced Functional Materials*, 2021, **31**(1): 2005361–23.

[7] CHERIAN A M, NAIR S V, MANIYAL V, *et al.* Surface engineering at the nanoscale: a way forward to improve coronary stent efficacy. *APL Bioengineering*, 2021, **5**(2): 1508–23.

[8] LAI Y L, CHENG P Y, YANG C C, *et al.* Electrolytic deposition of hydroxyapatite/calcium phosphate-heparin/gelatin-heparin tri-layer composites on NiTi alloy to enhance drug loading and prolong releasing for biomedical applications. *Thin Solid Films*, 2018, **649**: 192–201.

[9] WANG D, PENG F, LI J, *et al.* Butyrate-inserted Ni-Ti layered double hydroxide film for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated tumor and bacteria killing. *Materials Today*, 2017, **20**(5): 238–257.

[10] QI Y, QI H, HE Y, *et al.* Strategy of metal-polymer composite stent to accelerate biodegradation of iron-based biomaterials. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, **10**(1): 182–192.

[11] ZHAO Y, SUN Y H, LAN W W, *et al.* Self-assembled nanosheets on NiTi alloy facilitate endothelial cell function and manipulate macrophage immune response. *Journal of Materials Science & Technology*, 2021, **78**: 110–120.

[12] YU H, LIU Y, WANG Y, *et al.* A study on poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) covalently bonded NiTi surface for inhibiting protein adsorption. *Progress in Natural Science-Materials International*, 2016, **26**(6): 584–589.

[13] ZANG D, YI H, GU Z, *et al.* Interfacial engineering of hierarchically porous NiTi/hydrogels nanocomposites with exceptional antibiofouling surfaces. *Advanced Materials*, 2017, **29**(2): 1602869–7.

[14] QIU H, QI P, LIU J, *et al.* Biomimetic engineering endothelium-like coating on cardiovascular stent through heparin and nitric oxide-generating compound synergistic modification strategy. *Biomaterials*, 2019, **207**: 10–22.

[15] MOHAMMADI F, GOLAFSHAN N, KHARAZIHA M, *et al.* Chitosan-heparin nanoparticle coating on anodized NiTi for improvement of blood compatibility and biocompatibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, **127**: 159–168.

[16] WANG F, ZHANG Y, CHEN X M, *et al.* ALD mediated heparin grafting on nitinol for self-expanded carotid stents. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2016, **143**: 390–398.

[17] SU L C, CHEN Y H, CHEN M C. Dual drug-eluting stents coated with multilayers of hydrophobic heparin and sirolimus. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, **5**(24): 12944–12953.

[18] PARK C, LEE S W, KIM J, *et al.* Reduced fibrous capsule formation at nano-engineered silicone surfaces via tantalum ion implantation. *Biomaterials Science*, 2019, **7**(7): 2907–2919.

- [19] PARK C, PARK S, KIM J, *et al.* Enhanced endothelial cell activity induced by incorporation of nano-thick tantalum layer in artificial vascular grafts. *Applied Surface Science*, 2020, **508**: 144801–12.
- [20] PARK C, SEONG Y J, KANG I G, *et al.* Enhanced osseointegration ability of poly(lactic acid) via tantalum sputtering-based plasma immersion ion implantation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, **11**(11): 10492–10504.
- [21] ZHU S L, YANG X J, FU D H, *et al.* Stress-strain behavior of porous NiTi alloys prepared by powders sintering. *Materials Science and Engineering Structural Materials Properties Microstructure and Processing*, 2005, **408**(1/2): 264–268.
- [22] WAKABAYASHI H, SAN-NO T, TORIYAMA T, *et al.* The effect of temperature during helium ion implantation-induced crystallization of iron-based amorphous alloys. 14th International Conference on Ion Implantation Technology, Taos, New Mexico, 2003: 591–593.
- [23] ZIER M, OSWALD S, REICHE R, *et al.* XPS investigations of thin tantalum films on a silicon surface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research*, 2003, **375**(7): 902–905.
- [24] GENG X, XU W, WANG P, *et al.* Enhanced photocatalytic activity of nonstoichiometric crystalline TaO<sub>2</sub>F and Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> with carbon coating. *Ceramics International*, 2022, **48**(2): 1857–1868.
- [25] SIMPSON R, WHITE R G, WATTS J F. XPS investigation of monatomic and cluster argon ion sputtering of tantalum pentoxide. *Applied Surface Science*, 2017, **405**: 79–87.
- [26] BIKONDOA O, PANG C L, ITHNIN R, *et al.* Direct visualization of defect-mediated dissociation of water on TiO<sub>2</sub>(110). *Nature Materials*, 2006, **5**(3): 189–192.
- [27] 李晶. 多金属偶合腐蚀模型. 腐蚀与防护, 2017, **38**(1): 69–72.
- [28] 吴维昌译, 赵藻藩, 校. 标准电极电位数据手册, 1 版. 北京: 科学出版社, 1991: 154–222.
- [29] ZHUANG Y, ZHANG C, CHENG M, *et al.* Challenges and strategies for *in situ* endothelialization and long-term lumen patency of vascular grafts. *Bioactive Materials*, 2021, **6**(6): 1791–1809.
- [30] LYU N, DU Z, QIU H, *et al.* Mimicking the nitric oxide-releasing and glycocalyx functions of endothelium on vascular stent surfaces. *Advanced Science*, 2020, **7**(21): 2002330–12.
- [31] ZHAO T, LI Y, GAO Y, *et al.* Hemocompatibility investigation of the NiTi alloy implanted with tantalum. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2011, **22**(10): 2311–2318.