

Biocompatibility of Nanocrystal Iron Film Prepared by Filtered Cathodic Vacuum Arc

Yajuan Zhao, Hong Sun, Juan Wang*, Nan Huang*

Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu Sichuan
Email: juan.wang@yale.edu, huangnan1956@163.com

Received: Apr. 15th, 2018; accepted: May 9th, 2018; published: May 16th, 2018

Abstract

Iron and its alloys appear a high potential as biodegradable vascular stents materials, however, establishing a surface with good cytocompatibility and hemocompatibility remains a challenge. In this work, nanocrystal iron (NC-Fe) film was deposited on silicon substrate by filtered cathodic vacuum arc technique, the phase structure of NC-Fe film was analyzed by X-ray diffraction, we also cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human platelet on the film to investigate the cellular and blood compatibilities of the film. We found that the NC-Fe film surface significantly enhanced HUVEC adhesion and proliferation. Meanwhile, the NC-Fe film tended to inhibit platelet adhesion and activation. These data suggest the good potential of the NC-Fe film for improving biocompatibility of vascular devices.

Keywords

Filtered Cathodic Vacuum Arc Technique, Nanocrystal Iron Film, Biodegradable, Cytocompatibility, Hemocompatibility

磁过滤阴极真空弧源法制备纳米晶铁膜的生物相容性研究

赵雅娟, 孙 鸿, 王 娟*, 黄 楠*

西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室, 材料科学与工程学院, 四川 成都
Email: juan.wang@yale.edu, huangnan1956@163.com

*通讯作者。

收稿日期：2018年4月15日；录用日期：2018年5月9日；发布日期：2018年5月16日

摘要

铁及其合金是非常有潜力的血管支架材料，但就如何制备出具有良好细胞相容性和血液相容性的表面而言仍然充满挑战。本文通过磁过滤阴极真空弧源法在硅片表面沉积了纳米晶铁膜，用X射线衍射分析了纳米晶铁膜的物相结构，采用人脐静脉内皮细胞评价了薄膜的细胞相容性，血小板粘附实验评价了纳米晶铁膜的血液相容性。结果表明纳米晶铁膜表面提高了人脐静脉内皮细胞的粘附和增殖，同时，作为一种血液接触材料，纳米晶铁膜有抑制血小板粘附和激活的趋势。这些数据都表明纳米晶铁膜在改善血管植入器械的生物相容性上有巨大潜力。

关键词

磁过滤阴极真空弧源，纳米晶铁膜，生物可降解，细胞相容性，血液相容性

Copyright © 2018 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

随着人们生活水平的提高，饮食结构的改变，生活压力不断增大，动脉粥样硬化以及其他一些冠状动脉疾病的发病率逐年攀升，心血管疾病已经成为危害人类健康的头号杀手。冠心病的治疗方法主要有药物治疗、心脏搭桥手术以及微创介入治疗三种。1987年，Sigwart等人成功地实施了第一例冠状动脉支架植入手术[1]，血管支架植入术有效地使病变血管的狭窄部位得到扩张，减少了病变血管急性与慢性的弹性回缩，使再狭窄发生率降低到20%至30%，成为了冠心病治疗的有效手段。目前常用的血管支架有金属裸支架和药物洗脱支架，但它们都因永久存在的特性可能在术后发生再狭窄和晚期血栓的问题。可降解血管支架因其在完成血管支撑使命后能逐渐降解的特性被公认为是更具希望的新一代血管支架，可降解血管支架材料包括可降解高分子、纯镁及镁合金、纯铁及锌合金。有研究表明，可降解高分子支架的外形过大，还存在植入后不贴壁、植入早期回弹、局部炎症大等问题[2]；镁基支架的耐蚀性较差，植入三个月后就完全降解，在有氯离子存在的环境中腐蚀得更快[3] [4] [5]，这大大限制了镁合金血管支架的应用；纯锌的强度很低，关于如何提高锌基支架的力学相容性还需做更多的工作。而纯铁的生物相容性较好[6] [7] [8]，耐蚀性也优于镁合金，同时纯铁在强度、塑性、可加工性等方面都更为优异[9]。有研究者指出铁离子能通过影响与生长相关的基因表达水平来抑制血管平滑肌细胞的增生，从而降低了再狭窄率[8]。为了进一步提高纯铁表面的生物相容性，使纯铁支架表面具有更好的抗凝血性能和较好的内皮生长行为，需要对纯铁进行表面改性。常用的改善血管支架表面生物相容性的薄膜有钛氧膜 Ti-O [10] [11]，钛氮膜 Ti-N [12]，钽氮膜 Ta-N [13]以及类金刚石薄膜 DLC [14]等，这些薄膜都由于本身的不可降解性，不适合应用于可降解纯铁的表面。同时，也有研究表明采用纳米化处理，可以在较大程度上改善材料的表面性能[15]。因此，本文通过磁过滤阴极弧源法在硅片表面沉积了一种纳米晶铁膜，并用X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析了纳米晶铁膜薄膜的物相结构，在样品表面培养了人脐静脉内皮细胞，评价了薄膜的细胞相容性，开展了血小板粘附实验，体外评价了纳米晶铁膜的血液相容性。

2. 实验内容与方法

2.1. 纳米晶铁膜制备

纳米晶铁膜通过磁过滤阴极真空电弧技术被沉积在抛光硅晶片上, 制得的纳米晶铁膜铁含量为 99.99%。实验所用设备为 FDJ800 高真空磁过滤直流金属弧源沉积系统。在薄膜沉积之前, 使用功率为 300 W 的无线电频率, 基底被 Ar⁺溅射清洗 20 分钟, 以除去表面的污染物和氧化物。由于纯铁的磁性, 在沉积过程中电弧很难稳定。本实验中, 纳米晶铁膜沉积过程中, 无线电频率(RF)功率为 300 W, 而基底脉冲偏差为-150 V, Ar 气体以 20 个 sccm 的速率引入到腔体中, 沉积时间为 20 分钟。表 1 列出了沉积参数的更多细节。

2.2. 纳米晶铁膜结构表征

通过 X 射线衍射仪(XRD, Philips X'Pert, 荷兰)对纳米晶铁膜的相和晶体结构进行表征。测试条件为: CuK α ($\lambda = 0.15406$ nm), 激发功率为 45 kV \times 35 mA, 掠射角为 0.5°, 扫描步幅为 0.0330°。使用台阶仪 (AMBIOS XP-2, 美国)对纳米晶铁膜的厚度进行了测定。该纳米晶铁膜的表面形态由场发射扫描电子显微镜(FESEM, jsm-7001f, 日本)测定。

2.3. 体外细胞相容性试验—内皮细胞粘附与增殖试验

根据 Jaffe [16]等人的方法, 将人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)从新生儿的脐带中分离出来, 用酶消化。人脐静脉细胞被分离后, 用 M199 培养基(Gibco, USA)对内皮细胞进行培养, 并补充以 15%的胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)和 20 g/ml 内皮细胞生长增补剂(ECGS)。细胞在 37°C, 含有 5%二氧化碳的湿润空气中进行培养。为了研究内皮细胞在不同样品表面的增殖行为, 人脐静脉内皮细胞被分别接种到不锈钢、硅片、纯铁及纳米晶铁膜表面, 每个样品上接种内皮细胞的数目为 10⁴个。在预定的时间点(4 h、1 天、3 天)之后, 将样品取出, 并用 PBS 溶液洗去没有附着的细胞, 之后用 2.5%的戊二醛将样品固定 1 h。在这之后, 取 50 μ l 罗丹明 - 鬼笔环肽置于样品表面避光 20 分钟对内皮细胞进行染色, 然后用 PBS 溶液清洗样品。待样品干燥后, 使用荧光显微镜(Zeiss, 德国)对这些细胞进行了观察、拍照和计数。为了评估细胞粘附和增殖的情况, 每组平行样荧光照片至少取 12 张, 使用 IPWin60C 软件对其进行计数统计, 计算出附着在样本上的 HUVECs 的数量和细胞覆盖率。从 6 个随机区域的中选取的至少 400 个细胞计算了样品表面单个细胞铺展面积以及细胞短/长轴比。

2.4. 体外血液相容性试验—血小板粘附与增殖试验

用于统计计数的样本数量不少于 5 个, 并且每次试验的次数超过 3 次。实验所用的人体全血从成都血液中心合法获得。该分析是在献血后 8 小时内进行的。

对血液相容性的评估在细节上作了详细的说明。在纳米晶铁膜表面进行了血液相容性测试, 并使用 316L 不锈钢(SS)、硅片(Si)、纯铁(Fe)作为对照。对样品进行了静态血小板培养, 来评价样品的凝血活性, 并检验了血液与材料在体外的相互作用。

将重量百分比为 3.8%的柠檬酸加入新鲜血液中, 以 1500 转/分钟离心内 15 分钟后, 吸取上层血浆层 - 富

Table 1. Experimental parameters of the deposition of nanocrystal iron film

表 1. 沉积纳米晶铁膜的实验参数

Base vacuum (Pa)	RF power (W)	Bias voltage (V)	Ar flow (sccm)	Deposition time (min)
1e-3	300	-150	20	20

血小板血浆(PRP)。随后,取 60 μl PRP 添加到放置在 24 孔板中的样品表面,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 2 h,之后用 PBS 溶液仔细冲洗样品,以去除粘附不牢固的血小板。用 2.5%的戊二醛溶液固定样品 12 h,然后用 PBS 溶液清洗样品,重复三次。依次用体积比为 50%, 75%, 90%和 100%的乙醇/水溶液对样品进行逐级脱水,每组 15 min。待样品自然干燥后,对样品喷金,然后用扫描电子显微镜(JSM-7001FJEOL 场发射扫描电镜)进行形貌观察。本文中使用的科研用血符合伦理要求与实验规范。

3. 结果与讨论

3.1. 纳米晶铁膜结构表征结果分析

采用磁过滤阴极弧源法制备了纳米晶铁膜。磁过滤阴极真空弧源法的主要优点是利用一个弯曲的磁场来引导阴极真空电弧产生等离子体,从而将薄膜沉积在不可见的底物上。同时,大多数不必要的大颗粒和中性原子都可以通过电磁过滤器过滤[17]。较低的沉积速率利于制备具有良好致密性、平整度和均匀性的高质量薄膜。

图 1(a)是纳米晶铁膜和纯铁的 XRD 衍射图,从纳米晶铁膜和纯铁中都检测到了 $\alpha\text{-Fe}(110)$ 峰,可见两者的最强峰峰位很接近,主峰被标准化 $2\theta = 44.6^{\circ}$,但纳米晶铁膜的衍射峰明显宽化。根据 Scherrer 公式[18],计算出的平均晶体大小为 $5.7 \pm 2 \text{ nm}$ 。图 1(b)和图 1(c)分别是纳米晶铁膜表面的 SEM 图像和硅片表面的 SEM 图像,可以看到纳米晶铁膜的表面是十分光滑的,其表面没有观察到金属熔滴,这说明薄膜的沉积质量是较高的。沉积 20 min 后薄膜的厚度为 $130 \pm 10 \text{ nm}$ 。

3.2. 内皮细胞粘附与增殖结果分析

作为一种应用于血管支架或植入物的涂层,内皮细胞的快速再生是植入成功的关键。本文研究了纳米晶铁膜对内皮细胞生长行为的影响,粘附到不同材料表面的内皮细胞被进行了比较。图 2 是培养 4 小时,1 天和 3 天后样品表面内皮细胞的免疫荧光图像,可以看到与对照组相比,纳米晶铁膜上粘附的内皮细胞在任何一个时间点都是最多的。图 3 是培养 4 小时,1 天和 3 天后样品表面内皮细胞的数量、细胞覆盖率、单个细胞铺展面积以及内皮细胞短轴与长轴的比值。与对照样形成鲜明对比的是,纳米晶铁膜表面粘附的 HUVECs 具有很好的铺展和骨架发展。其表面细胞粘附数量和细胞覆盖率较对照样显著提高(图 3(a), 图 3(b))。单个细胞铺展面积较 316L SS 提高了(图 3(c))。其细胞短/长轴比值也显著降低(图 3(d)),说明纳米晶铁膜上内皮细胞的活性是较强的。以上 HUVECs 培养结果说明纳米金铁膜对内皮细胞粘附和增殖是有利且安全的。

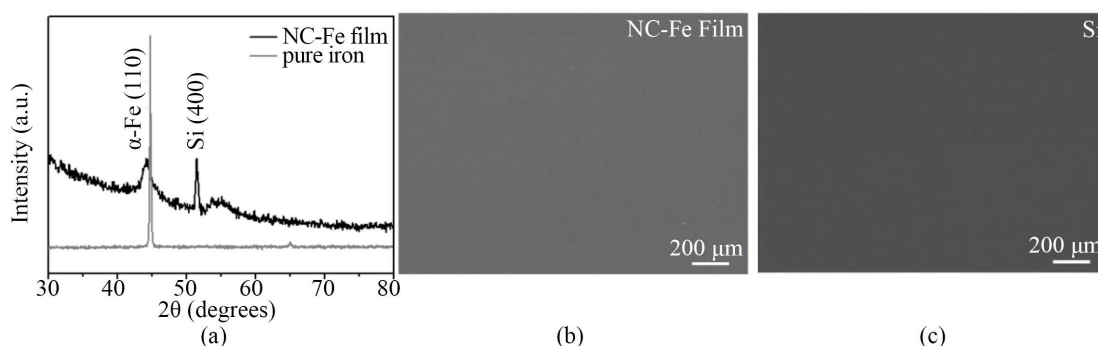


Figure 1. (a) X-ray diffraction pattern of NC-Fe film deposited on a silicon substrate compared to that of bulk pure iron; (b) Surface SEM image of NC-Fe film; (c) Surface SEM image of silicon substrate

图 1. (a) 沉积在硅片上的纳米晶铁膜与纯铁的 X 射线衍射图谱; (b) 纳米晶铁膜的表面 SEM 图像; (c) 硅片表面的 SEM 图像

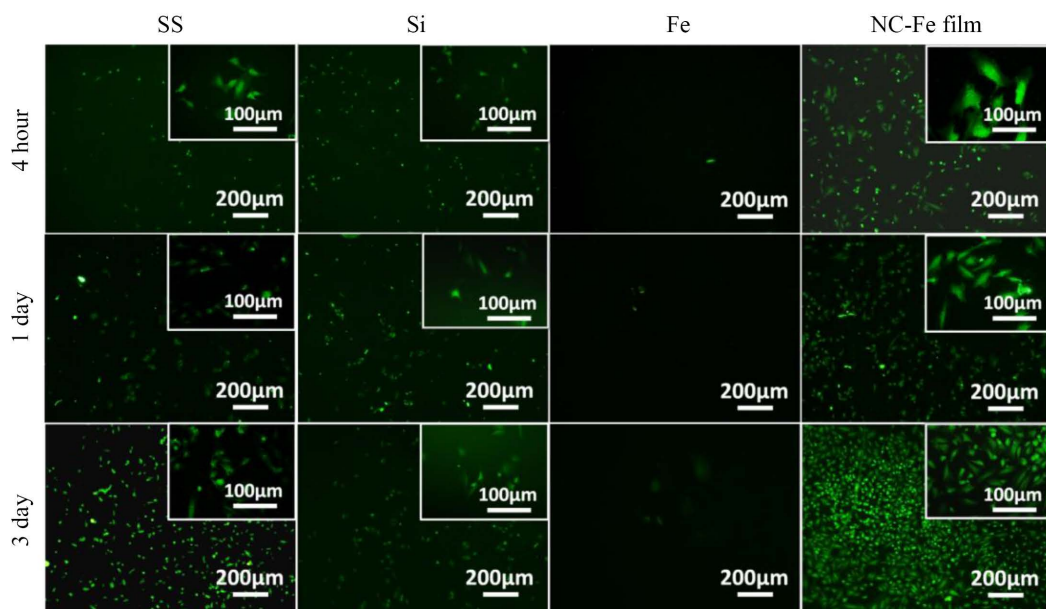


Figure 2. Immunofluorescent images of endothelial cells (ECs) on the samples surfaces after 4 hours, 1 and 3 days of culture

图 2. 培养 4 小时, 1 天和 3 天后样品表面内皮细胞的免疫荧光图

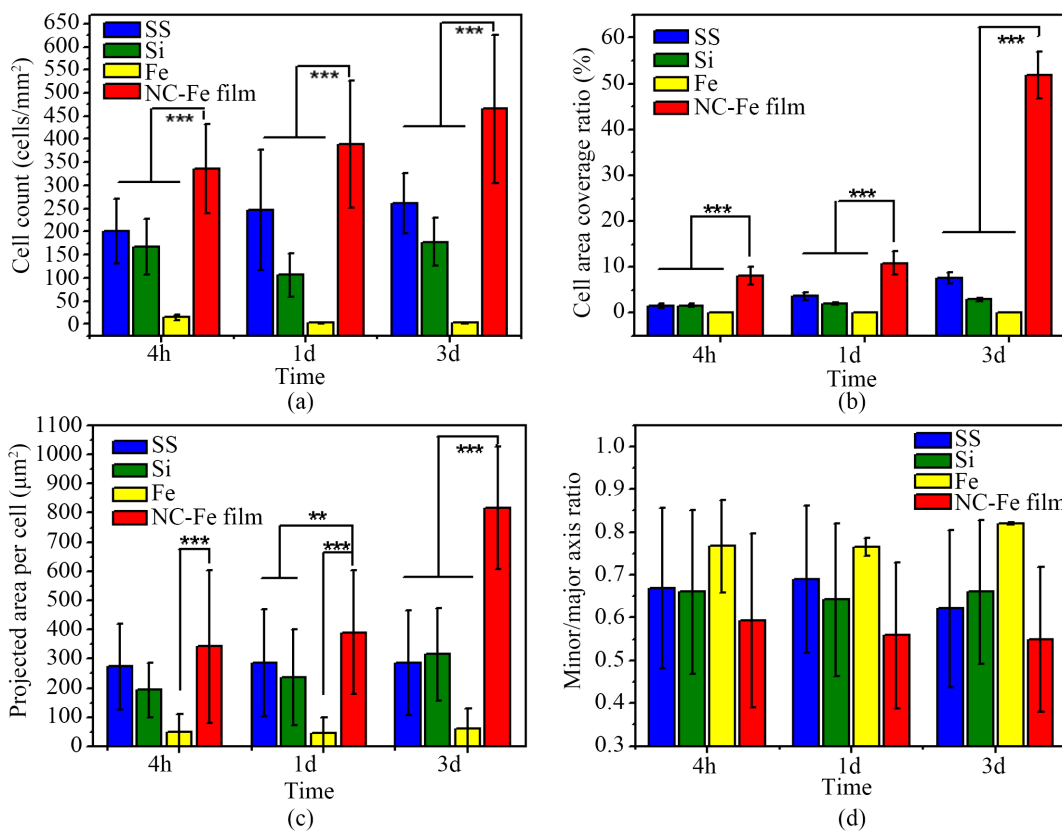


Figure 3. Amounts, cover ratio, projected area per cell and minor/major axis ratio of ECs on the samples surfaces after 4 hours, 1 and 3 days of culture

图 3. 培养 4 小时, 1 天和 3 天后样品表面内皮细胞的数量, 细胞覆盖率, 单个细胞铺展面积以及细胞短/长轴比

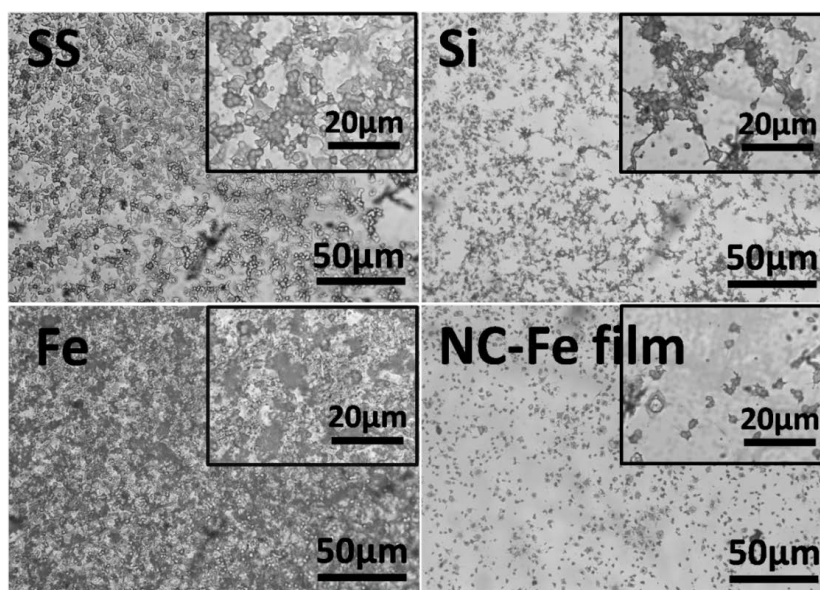


Figure 4. The morphologies of adherent platelets on the samples surfaces incubated in PRP for 2 hours

图 4. 在 PRP 中培养 2 小时后样品表面附着血小板的形态

纳米晶铁膜显著地刺激了 HUVECs 的粘附、生存和增殖。它揭示了纯铁纳米晶体膜作为一种可生物降解的涂层，为早期提高内皮化提供了一个相对稳定的界面，并避免了由于纯铁的快速表面腐蚀而对 HUVEC 的生长产生负面影响。有研究表明，较低浓度的铁离子可对 ECs 的代谢活动产生良好的影响，相反，当铁离子浓度超过 50 g/ml 时会对细胞产生毒性[19]。

3.3. 血小板粘附实验结果分析

图 4 是样品在 PRP 中培养 2 小时后不同样品血小板的粘附形貌。在血液相容性试验中，作为对照样品不锈钢和硅表面有大量的附着血小板，大多数血小板被粘附、聚集和激活到完全扩散状态的程度，同时基底材料硅表面的血小板也呈现出树枝状激活态。由于快速的表面腐蚀，纯铁上的血小板的形态被破坏。与对照样相比，纳米晶铁膜表面上附着了少量，独立且没有铺展的血小板。这是由于纳米晶铁膜表面粗糙度较低，有助于降低纤维蛋白原的吸收。

4. 结论

纳米晶铁膜是一种由磁过滤阴极真空电弧技术制备的可生物降解的金属膜。它展现出了良好的生物相容性与较高的内皮细胞活性和低凝血性。该研究为生物活性金属界面的发展提供了一种有前途的方法。

致 谢

这项工作由国家自然科学基金青年基金项目(31600766)、中央高校基本科研业务费理工类科技创新项目(2682016CX076)、国家自然科学基金 81271701、81330031 支持。

参考文献

- [1] Sigwart, U., Puel, J., Mirkovitch, V., *et al.* (1987) Intravascular Stents to Prevent Occlusion and Restenosis after Transluminal Angioplasty. *New England Journal of Medicine*, **316**, 701-706. <https://doi.org/10.1056/NEJM198703193161201>
- [2] Hou, L.D., Zhen, L.I., Pan, Y., *et al.* (2016) A Review on Biodegradable Materials for Cardiovascular Stent Applica-

- tion. *Frontiers of Materials Science*, **10**, 238-259. <https://doi.org/10.1007/s11706-016-0344-x>
- [3] Di, M.C., Griffiths, H., Goktekin, O., *et al.* (2004) Drug-Eluting Bioabsorbable Magnesium Stent. *Journal of Interventional Cardiology*, **17**, 391-395. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8183.2004.04081.x>
- [4] Heublein, B., Rohde, R., Kaese, V., *et al.* (2003) Biocorrosion of Magnesium Alloys: A New Principle in Cardiovascular Implant Technology? *Heart*, **89**, 651-656. <https://doi.org/10.1136/heart.89.6.651>
- [5] Waksman, R. (2005) Metallic Bioabsorbable Stents: Concepts, Experimental Findings, Early Clinical Results, and the Future. *Acc Current Journal Review*, **14**, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.accreview.2005.10.079>
- [6] Peuster, M., Wohlsein, P., Brüggmann, M., *et al.* (2001) A Novel Approach to Temporary Stenting: Degradable Cardiovascular Stents Produced from Corrodible Metal-Results 6-18 Months after Implantation into New Zealand White Rabbits. *Heart*, **86**, 563. <https://doi.org/10.1136/heart.86.5.563>
- [7] Peuster, M., Hesse, C., Schloo, T., *et al.* (2006) Long-Term Biocompatibility of a Corrodible Peripheral Iron Stent in the Porcine Descending Aorta. *Biomaterials*, **27**, 4955-4962. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.029>
- [8] Mueller, P.P., May, T., Perz, A., *et al.* (2006) Control of Smooth Muscle Cell Proliferation by Ferrous Iron. *Biomaterials*, **27**, 2193-200. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.042>
- [9] Mani, G., Feldman, M.D., Patel, D., *et al.* (2007) Coronary Stents: A Materials Perspective. *Biomaterials*, **28**, 1689. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.042>
- [10] Huang, N., Yang, P., Leng, Y.X., *et al.* (2003) Hemocompatibility of Titanium Oxide Films. *Biomaterials*, **24**, 2177-2187. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00046-2)
- [11] Huang, N., Yang, P., Leng, Y.X., *et al.* (2004) Surface Modification of Biomaterials by Plasma Immersion Ion Implantation. *Surface & Coatings Technology*, **186**, 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2004.04.041>
- [12] Jones, M.I., Mccoll, I.R., Grant, D.M., *et al.* (2015) Protein Adsorption and Platelet Attachment and Activation, on TiN, TiC, and DLC Coatings on Titanium for Cardiovascular Applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, **52**, 413-421. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200011\)52:2<413::AID-JBM23>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200011)52:2<413::AID-JBM23>3.0.CO;2-U)
- [13] Leng, Y.X., Sun, H., Yang, P., *et al.* (2001) Biomedical Properties of Tantalum Nitride Films Synthesized by Reactive Magnetron Sputtering. *Thin Solid Films*, **398-399**, 471-475. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(01\)01448-1](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(01)01448-1)
- [14] Cui, F.Z. and Li, D.J. (2000) A Review of Investigations on Biocompatibility of Diamond-Like Carbon and Carbon Nitride Films. *Surface & Coatings Technology*, **131**, 481-487. [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(00\)00809-4](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(00)00809-4)
- [15] Zhang, X., Cong, L., Shi, M., *et al.* (2008) The Relation between Grain Size and the Corrosion Resistance of Nanocrystalline Zircaloy-4. *Rare Metal Materials & Engineering*, **37**, 273-276.
- [16] Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., *et al.* (1973) Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification by Morphologic and Immunologic Criteria. *Journal of Clinical Investigation*, **52**, 2745. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>
- [17] Shi, J.R., Shi, X., Sun, Z., *et al.* (2000) Structural and Mechanical Properties of Amorphous Silicon-Carbon Alloy Films Deposited by Filtered Cathodic Vacuum Arc Technique. *International Journal of Modern Physics B*, **14**, 315-320. <https://doi.org/10.1142/S0217979200000327>
- [18] Patterson, A.L. (1939) The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. *Physical Review Journals of Archive*, **56**, 978-982. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.56.978>
- [19] Zhu, S., Huang, N., Xu, L., *et al.* (2009) Biocompatibility of Pure Iron: *In Vitro*, Assessment of Degradation Kinetics and Cytotoxicity on Endothelial Cells. *Materials Science & Engineering C*, **29**, 1589-1592. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.019>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2160-7613，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

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

期刊邮箱：ms@hanspub.org