

源气体流量比对氟化类金刚石薄膜蛋白吸附能力的影响

戴永丰 江美福[†] 杨亦赏 周 杨

(苏州大学物理科学与技术学院, 苏州 215006)

(2010 年 12 月 17 日收到; 2011 年 1 月 19 日收到修改稿)

用 316L 不锈钢(SU316L)作基片,以高纯石墨作靶、 CHF_3 和 Ar 作源气体,采用反应磁控溅射法在不同流量比 $R(\text{CHF}_3/\text{Ar})$ 下制备了氟化类金刚石(F-DLC)薄膜. 利用双蒸水液滴法、BCA(二喹啉甲酸)法和傅里叶红外光谱(FTIR)探讨了影响薄膜蛋白吸附能力的因素. 结果表明,镀有 F-DLC 薄膜的 SU316L 表面的血小板黏附量明显减少,血小板的变形程度显著减轻,相应的白蛋白与纤维蛋白原的吸附比普遍高于未镀膜的 SU316L 表面的相应值,说明镀上 F-DLC 薄膜可以改善样品的血液相容性. 流量比为 2:1 左右时制备出的 F-DLC 薄膜,其白蛋白与纤维蛋白原的吸附比值达到最大,相应的血液相容性最佳. 对薄膜的接触角和表面能以及 FTIR 光谱分析研究表明, SU316L 表面的 F-DLC 薄膜的白蛋白与纤维蛋白原的吸附比及血液相容性与薄膜中的 $-\text{CF}_x$ 键的含量(F/C 比)和表面能(疏水性)直接相关,控制源气体流量比可以实现对薄膜的血液相容性的调制.

关键词: 反应磁控溅射, 氟化类金刚石薄膜, 蛋白吸附

PACS: 81.05.Uw, 81.15.Cd, 87.15.kt

1. 引言

随着医疗水平的不断提高,新材料研究的迅猛发展,多种新型材料制作的植入电极、人工关节、心脏瓣膜、血管支架等已在临床上获得了应用. 由于人体的天然排异性,植入人体内的生物材料不仅要具有临床使用所需要的理化性能,同时要具有良好的血液相容性,即植入人体后,不引起血液凝聚,不破坏血液成分,也不改变血液生理环境的性质,也是其必须面临的关键问题. 316L 不锈钢(SU316L)由于其具有良好的耐腐蚀性、可塑性和韧性等性能,常用来制作人工心脏瓣膜、血管支架等,已被广泛地应用在临床治疗中^[1,2],但临床应用中出现的离子渗出^[3]、表面形成血栓^[4]等问题,限制了相关器械的使用寿命. 相关的研究表明^[5,6],材料与血液接触,血浆蛋白将首先被吸附在材料表面,形成蛋白吸附层,在此基础上再引起血小板的黏附、变形,最终导致血栓形成. 因此,如何对 SU316L 材料制作的器械进行表面改性以降低纤维蛋白原与白蛋白的吸附比,提高其血液相容性引起了业内人士的广

泛关注.

目前的研究表明,在 SU316L 材料表面形成致密的惰性薄膜,既可以防止金属离子渗出,又可以在一定程度上提高其血液相容性. Gutensohn 等^[7]用等离子体诱导的冷沉积技术在 SU316L 血管支架表面制备了类金刚石(DLC)薄膜,经实验证实类金刚石薄膜可以减少不锈钢中 Ni, Cr, Mn, Mo 等金属离子在血液中的溶出,提高 SU316L 的血液相容性. Ding 等^[8]研究了磁控溅射法在 SU316L 表面沉积 $\text{TaC}_x\text{N}_{1-x}$ 薄膜,发现镀层具有优异的硬度和耐腐蚀性,并可提高血液相容性.

F-DLC 薄膜由于具有优异的耐磨性、热稳定性、疏水性和耐腐蚀能力^[9-11],有望在改善植入体内的器械的血液相容性方面发挥重要作用. Terumitsu 等^[12]采用 PECVD 法在聚碳酸酯(PC)表面制备了 DLC 和 F-DLC 薄膜,对比了 DLC 和 F-DLC 薄膜对血小板的黏附和变形及血浆蛋白的吸附的影响,发现 F 的掺入可以降低血小板的黏附和变形程度,增强白蛋白与纤维蛋白原的吸附比,提高血液相容性,但相关的影响机理还不甚清楚. 进一步探讨薄膜的血液相容性与 F 的接入方式,含量以及制备条

[†] 通讯联系人. E-mail: dxwlb@suda.edu.cn

件之间的关联,对于了解相关机理和探索相关的临床应用是十分必要的.

本文使用高纯石墨作靶,CHF₃和Ar作源气体,采用反应磁控溅射法在改变源气体流量比 R (CHF₃/Ar)的条件下在SU316L基底上制备了F-DLC薄膜,观察、测试了其蛋白吸附的效果,并通过分析其傅里叶红外光谱、表面能(疏水性)等,探讨了F-DLC薄膜表面的蛋白吸附能力,血液相容性与源气体流量比之间的关联.

2. 实验安排

采用JGP-450A8高真空多功能磁控溅射仪制备F-DLC薄膜样品. 射频频率为13.56 MHz,系统的本底真空为 5×10^{-4} Pa. 实验采用单面抛光的SU316L为基片,制备前用盐酸、氨水、双氧水及去离子水依次进行了超声波清洗. 溅射靶材是纯度为99.99%的高纯碳靶,极间距为45 mm. 射频功率和工作气压分别为120 W和2 Pa,源气体为CHF₃和Ar的混合气体,由两路独立的质量流量计分别控制其流量,在不同的流量比下经混气室先行混合后再进入真空室进行溅射成膜.

薄膜的红外透射光谱测试采用了JASCO 600PLus型傅里叶红外光谱仪(FTIR),波数范围为400—4000 cm⁻¹;利用SL200A型接触角仪测量了不同流量比下F-DLC薄膜的接触角.

薄膜的蛋白吸附能力则是通过牛血清白蛋白(BSA)和牛血浆纤维蛋白原在薄膜上的吸附量来反映的^[12]. 将牛血清白蛋白和牛血浆纤维蛋白原溶于磷酸盐缓冲液(PBS)按生理浓度分别配置成30 mg/ml和3 mg/ml的溶液. 然后将316L不锈钢基片与镀有F-DLC薄膜的SU316L样品置于24孔板,取1 ml白蛋白溶液或1 ml纤维蛋白原溶液种于样品表面,在37 °C,5% CO₂(模仿人体内环境)条件下培养1 h. 1 h后,样品用pH 7.4的PBS漂洗两次. 将样品在250 μl含1%十二烷基硫酸钠(SDS)的PBS中培养1 h,洗涤吸附的蛋白. 最后利用BCA法测定蛋白吸附量.

利用高倍数字显微镜观察了F-DLC薄膜表面的血小板的黏附数目和形态^[12]. 首先从至少10天未服药的健康志愿者抽取45 ml全血,与5 ml的酸性柠檬酸葡萄糖(ACD)混合配置成抗凝人血. 用180 g离心分离10 min,获取富血小板血浆(PRP).

然后,部分PRP用2000 g离心分离20 min,获取贫血小板血浆(PPP). 用PPP稀释PRP,配置成浓度约为 1.5×10^5 个/μl的血小板悬液. 样品用pH 7.4的PBS漂洗,然后将样品置于24孔板,取血小板悬液2 ml种于样品表面,于37 °C,5% CO₂(模仿人体内环境)条件下培养1 h. 1 h后,样品用pH 7.4的PBS漂洗,2.5%戊二醛固定1 h,再由乙醇系列(20, 40, 60, 80, 100% 每样15 min)脱水,在CO₂干燥箱中干燥1 h. 利用高倍数字显微镜对干燥后的样品进行显微观察,对每个样品随机选取10个均匀分布的区域进行拍照,观察血小板的黏附数目和形态.

3. 结果与讨论

3.1. F-DLC薄膜的血小板黏附和变形

未镀膜的SU316L空白基片和在120 W射频输入功率,2 Pa工作气压、流量比 R 为2:1条件下沉积的F-DLC薄膜表面的血小板黏附实验的显微照片分别如图1(a)和(b)所示. SU316L和不同流量比下F-DLC薄膜单位面积(17500 μm²)上的血小板吸附数量如图2所示.

由图1和图2可以发现,镀有F-DLC薄膜的SU316L上的血小板黏附量和变形^[13,14]程度明显小于未镀膜的SU316L,也远低于Terumitsu等人采用PECVD等方法制备出的F-DLC薄膜对血小板的黏附^[12]. 这表明在SU316L表面镀上F-DLC薄膜后确实可以减少样品的血小板黏附量,明显改善血小板的变形程度. 当然F-DLC薄膜对血小板黏附还与薄膜的制备方法有关,磁控溅射法值得进一步关注.

3.2. F-DLC薄膜的蛋白吸附分析

SU316L空白基片和不同流量比下制备的F-DLC薄膜的白蛋白和纤维蛋白原吸附量如图3所示.

图3(a)显示,SU316L空白基片吸附有较多的白蛋白,而镀有F-DLC薄膜的SU316L的白蛋白吸附量有所下降,但在流量比 R 为2:1时,薄膜表面的白蛋白吸附量突然增加,与SU316L空白基片的吸附量相近. 图3(b)给出了样品表面纤维蛋白原的吸附变化. 图中清楚显示出SU316L基片吸附有较多的纤维蛋白原,镀有F-DLC薄膜的SU316L其纤维蛋白原吸附量显著减少.

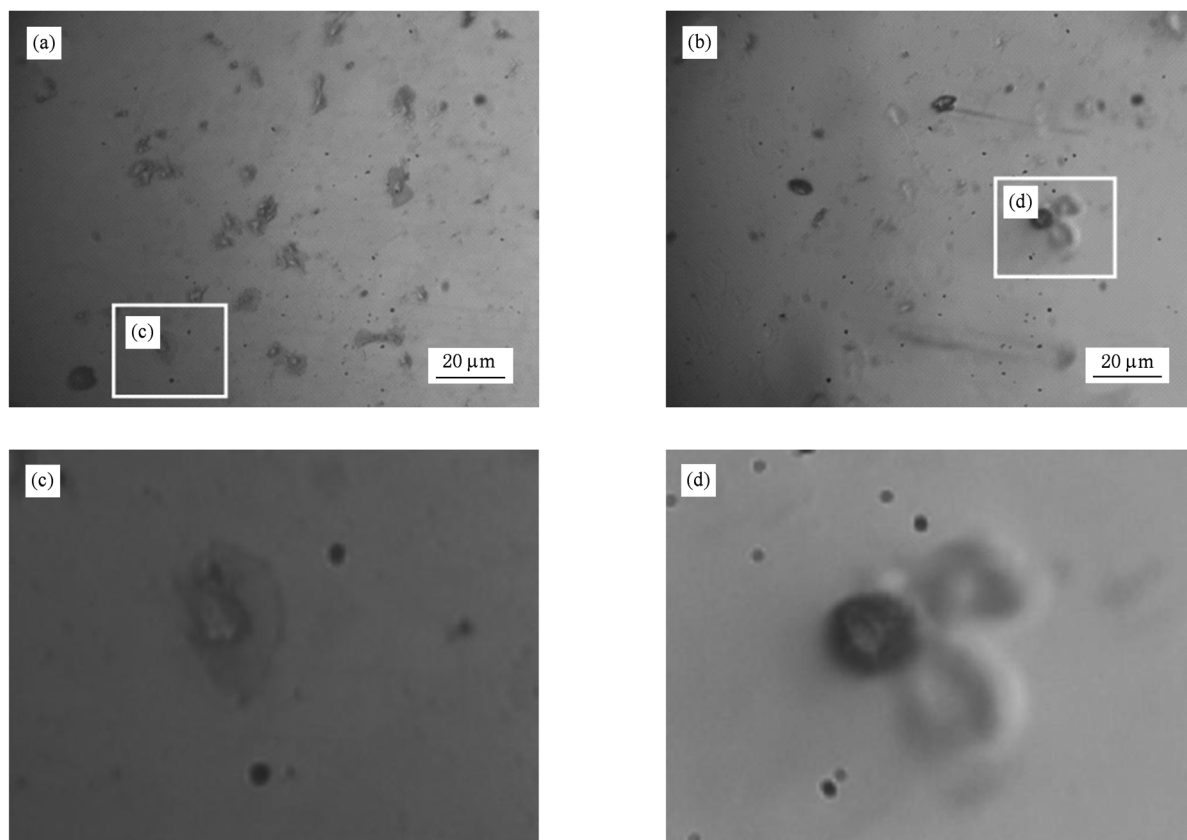


图1 黏附于 SU316L 基片表面(a),局部放大图(c)和典型的镀有 F-DLC 薄膜的 SU316L 表面(b),局部放大图(d)的血小板显微图像

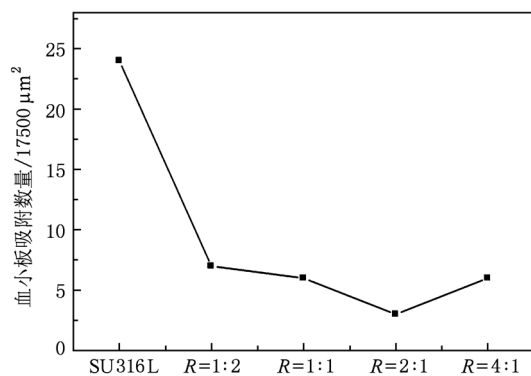


图2 SU316L 和不同流量比下 F-DLC 薄膜单位面积 (17500 μm^2) 上的血小板吸附数量

事实上,材料表面血小板的黏附决定于材料表面血浆蛋白的吸附^[15-18]. 吸附的血浆蛋白中,吸附在材料表面的白蛋白能减少血小板黏附,使材料表现出良好的血液相容性,而材料吸附纤维蛋白原越多,导致凝血的可能性就越大. 白蛋白与纤维蛋白原的比值是研究材料血液相容性的决定性因

素^[19-21]. 白蛋白与纤维蛋白原的比值越高,则材料表面黏附的血小板就越少,材料的血液相容性就越好.

图4给出了不同样品的白蛋白与纤维蛋白原的吸附比. 由图可见,镀上 F-DLC 薄膜后的 SU316L 其白蛋白与纤维蛋白原的吸附比明显增加,且在流量比为 2:1 时,吸附比达到最大. 综合图3和图4可以推定,在流量比为 2:1 时制备的薄膜表面黏附的血小板最少,相应的血液相容性应该最好.

为了进一步探讨源气体流量比对 F-DLC 薄膜的蛋白吸附能力的影响,本项目通过悬滴法及红外光谱对所制备的 F-DLC 薄膜进行了表面能和结构分析.

3.3. F-DLC 薄膜的接触角,表面能测试及分析

当生物材料与血液接触时,血浆蛋白的吸附与材料的表面能密切相关^[12,22],材料的表面能越低,材料表面吸附的蛋白越少. 而材料的表面能通常采用材料表面的接触角计算得到.

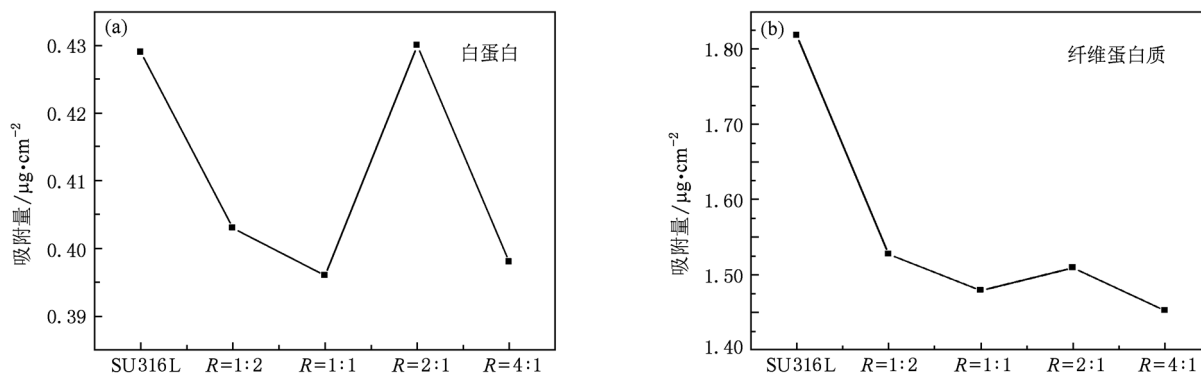


图3 SU316L 和不同流量比下 F-DLC 薄膜的白蛋白(a)和纤维蛋白原(b)的吸附量

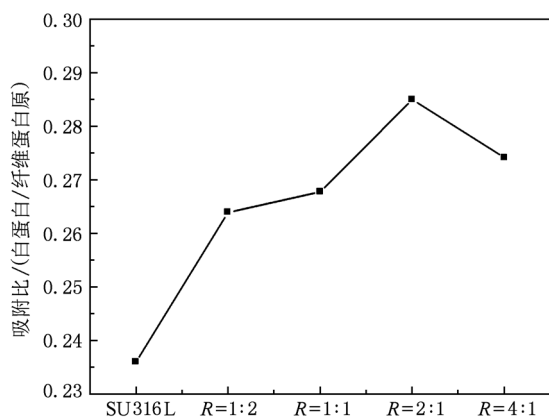


图4 SU316L 和不同流量比下 F-DLC 薄膜的白蛋白与纤维蛋白原的吸附比

薄膜与水滴的接触角是通过 SL200A 型接触角仪测量得到的. 实际测量时采用了影像分析悬滴法测量薄膜与双蒸水之间的接触角, 接触角测量仪在每个样品表面不同位置测量 5 次, 读取液滴左右两边的数据, 最后取其平均值.

图 5 和表 1 分别给出了采用悬滴法测定双蒸水液滴在不同流量比 R (1:2, 1:1, 2:1, 4:1) 条件下所制备的 F-DLC 薄膜和 SU316L 基片表面的接触角影像及表面接触角和表面能.

表 1 显示, F-DLC 薄膜的接触角都在 90° 以上, 流量比 R 为 2:1 时达到最大值 99.47° (表面能为最小值 23.36 mJ/m^2), 但当流量比 R 继续增加到 4:1 时, 接触角只有 96.66° (相应表面能为 25.09 mJ/m^2). 可见, 在所选择的制备条件下 (工作气压为 2 Pa, 功率为 120 W), 薄膜均具有较好的疏水特性, 且存在一个最佳流量比 ($R = 2:1$), 在小于此流量比

时, 适当增加流量比, 有助于加大接触角, 减小薄膜的表面能, 减少蛋白的吸附量; 但大于此流量比时, 薄膜的表面能又将增大, 蛋白的吸附量也随之增加.

上述分析显示, 薄膜的蛋白吸附和表面能变化与源气体的流量比之间确实存在关联, 但又不是单调减少的对应关系, 应该与薄膜的键结构有关. 为了进一步揭示不同流量比条件下氟与碳的交联形式和氟的掺入对薄膜结构的影响, 对薄膜作了红外吸收光谱分析.

3.4. F-DLC 薄膜的红外吸收光谱分析

图 6 是扣除膜厚的影响后在不同流量比条件下沉积的 F-DLC 薄膜的红外吸收光谱, 图中显示薄膜的两个主要吸收带, 分别是: $800\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$ 范围的 —CF_x ($x = 1, 2, 3$) 伸缩振动和 $1500\text{--}1900 \text{ cm}^{-1}$ 范围的 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动^[23–28].

对图 6 进行解析后可知本项目沉积的 F-DLC 薄膜中的 CF_x ($x = 1, 2, 3$) 振动模式主要由 1010 cm^{-1} 附近 CF_2 中的 C—F 伸缩振动, 1160 cm^{-1} 附近的 CF_2 对称伸缩振动, 1220 cm^{-1} 附近的 CF_2 链式振动, 1260 cm^{-1} 附近的 CF_2 反对称伸缩振动组成, 以及 1330 cm^{-1} 附近的 C—F 伸缩 (链式) 振动.

C—F 薄膜的红外吸收光谱中 $800\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$ 与 $1500\text{--}1900 \text{ cm}^{-1}$ 区域的面积比 $S_{\text{—CF}_x}/S_{\text{C}=\text{C}}$, 通常可以定性反映出薄膜中 —CF_x 键和 $\text{C}=\text{C}$ 键的相对含量 (F/C 比). 不同流量比下制备的 F-DLC 薄膜中的 $S_{\text{—CF}_x}/S_{\text{C}=\text{C}}$ 的变化趋势如图 7 所示. 不难看出, 随着源气体流量比 R 的增加, 薄膜中的 —CF_x 键相对含量总体呈增加趋势, 且在 R 为 2:1 左右时达到最大 (10.4).

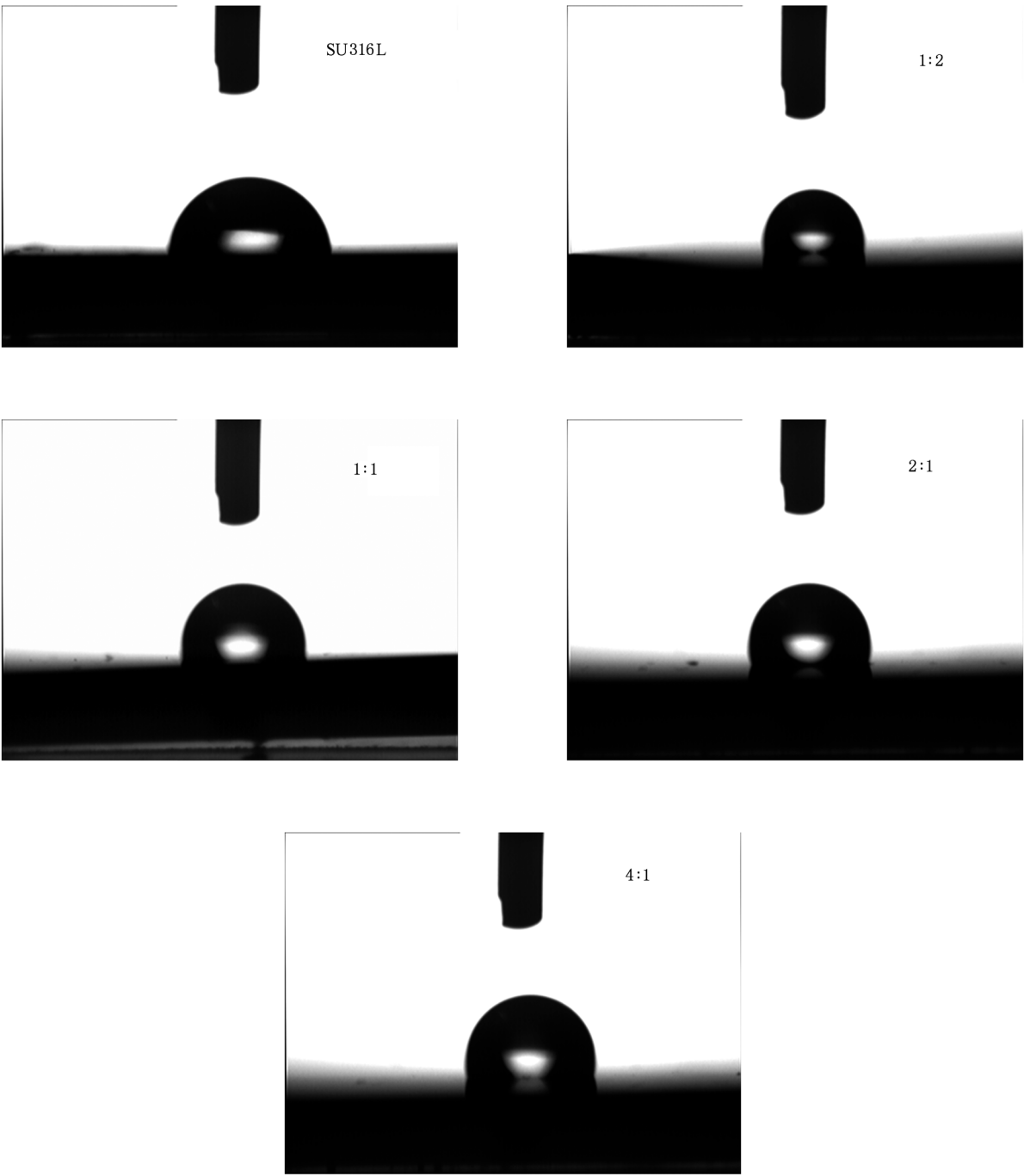


图5 SU316L 和不同流量比下 F-DLC 薄膜的接触角图像

表1 SU316L 基片和不同流量比下 F-DLC 薄膜的接触角和表面能

<i>R</i>	SU316L	1:2	1:1	2:1	4:1
接触角/(°)	77.32	91.64	97.46	99.47	96.66
表面能/(mJ/m ²)	37.16	28.20	24.60	23.36	25.09

如前所述,在流量比为 2:1 时制备的薄膜样品,其表面黏附的血小板最少,白蛋白与纤维蛋白原的比值最大,水接触角最大,表面能最小,相应的血液

相容性应该最好. 这与 Ishihara 等^[29]研究的薄膜中的—C—CF 键的减少及—CF 和—CF₂ 键的增加,将导致薄膜表面能的降低的结果是一致的.

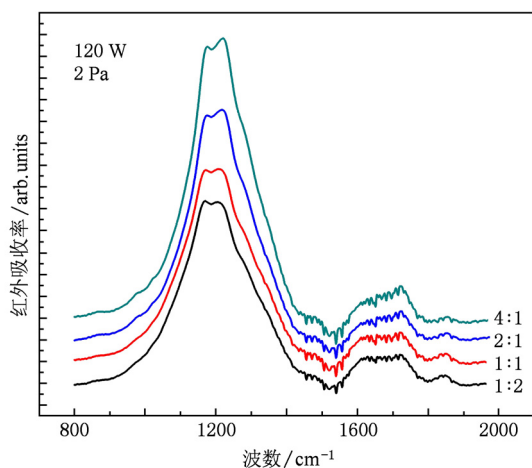
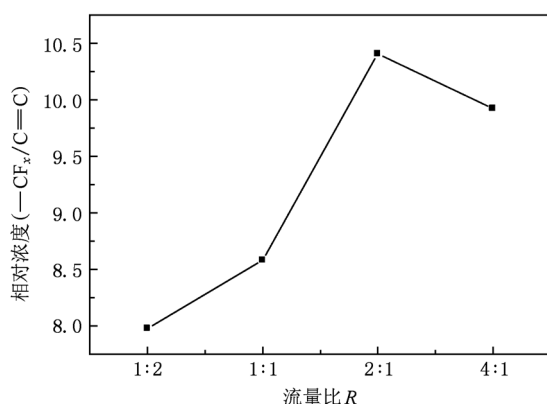


图6 F-DLC 薄膜的红外吸收光谱

图7 F-DLC 薄膜中 $-\text{CF}_x$ 键和 $\text{C}=\text{C}$ 键的相对浓度随流量比的变化

可以推定, F-DLC 薄膜的血液相容性与薄膜中的 $-\text{CF}_x$ 键的形成和含量应该直接相关, 至于 F 的接入方式以及薄膜中 $-\text{CF}$ 和 $-\text{CF}_2$ 键各自所起的作用值得进一步关注, 相关的研究正在进行中。

4. 结 论

1. 在 SU316L 表面镀上反应磁控溅射法制备的 F-DLC 薄膜后可以明显减少样品的血小板黏附量, 改善血小板的变形程度。

2. 白蛋白与纤维蛋白原的比值是研究材料血液相容性的决定性因素。结果显示 SU316L 表面镀上 F-DLC 薄膜后, 相应的白蛋白与纤维蛋白原的比值普遍高于未镀膜的 SU316L 表面的相应值, 说明镀上 F-DLC 薄膜可以改善样品的血液相容性, 且在源气体 CHF_3 与 Ar 的流量比在 2:1 左右时白蛋白与纤维蛋白原的比值最高, 血液相容性最好。

3. 改变源气体流量比可以调制薄膜中的 $-\text{CF}_x$ 键和 $\text{C}=\text{C}$ 键的相对含量及 F/C 比, 从而影响薄膜的表面能和疏水性, 实现对薄膜的血液相容性的调控。相关的详细机理值得进一步关注。

衷心感谢叶超老师、唐仲英血液中心的朱力老师、阮长耿血液研究中心的白露老师, 在薄膜表面接触角、表面能测量及血小板黏附、蛋白吸附检测过程中给予的大力支持和帮助。

- [1] Park J B, Kim Y K 2003 *Biomaterials Principles and Applications* (Boca Raton; CRC Press) p1
- [2] Brunski J B 2004 *Biomaterials Science an introduction to Materials in Medicine* (San Diego; Elsevier Academic Press) p137
- [3] Haidopoulos M, Turgeon S, Sarra-Bournet C 2006 *Mater. Sci. : Mater. Med.* **17** 647
- [4] Yu Y T 2000 *Bio-medical Materials* (Tianjin; Tianjin University Press) p20 (in Chinese) [俞耀庭 2000 生物医用材料(天津: 天津大学出版社)第20页]
- [5] Gorbet M B, Sefton M V 2004 *Biomaterials* **25** 5681
- [6] Armitage D A, Parker T L, Grant D M 2003 *Biomed. Mater. Res. A* **66** 129
- [7] Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Fenner T, Grewe P, Koester R, Padmanaban K, Kuehn P 2000 *Thrombosis Res.* **99** 577
- [8] Ding M H, Wang B L, Li L, Zheng Y F 2010 *Surf. Coat. Technol.* **204** 2519
- [9] Zhu L, Jiang M F, Ning Z Y, Du J L, Wang P J 2009 *Acta Phys. Sin.* **58** 6430 (in Chinese) [朱 丽、江美福、宁兆元、杜记龙、王培君 2009 物理学报 **58** 6430]
- [10] Wang P J, Jiang M F, Xin Y, Du J L, Dai Y F 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 8920 (in Chinese) [王培君、江美福、辛 煜、杜记龙、戴永丰 2010 物理学报 **59** 8920]
- [11] Hakovirta M, He X M, Nastasi M 2000 *J. Appl. Phys.* **88** 1456
- [12] Terumitsu H, Satoshi Y, Aki K, Yuko O, Atsushi H, Koki T, Tetsuya S 2007 *Biomed. Mater. Res. A* **83** 1192
- [13] Goodman S L, Grasel T G, Cooper S L, Albrecht R M 1989 *Biomed. Mater. Res.* **23** 105
- [14] Allen R D, Zacharski L R, Widirstky S T, Rosenstein R, Zaitlin L M, Burgess D R 1979 *Cell Biol.* **83** 126
- [15] Yu K, Chen Z T, Qiu J 1996 *Biomed. Eng.* **13** 189 (in Chinese) [喻 凯、陈治涛、邱 静 1996 生物医学工程杂志 **13** 189]
- [16] Wen X J 1997 *Biomed. Eng.* **14** 164 (in Chinese) [文学军 1997 生物医学工程杂志 **14** 164]
- [17] Wang C H, Leng X G 1998 *Foreign Medical Sciences (Biomedical Engineering Fascicle)* **21** 1 (in Chinese) [王传华、

- 冷希岗 1998 国外医学:生物医学工程分册 **21** 1]
- [18] Whicher S J, Brash J L 1978 *Biomed. Mater. Res.* **12** 181
- [19] Dion I, Roques X, Baquey C, Baudet E, Cathalinat B B, More N 1993 *Biomed. Mater. Eng.* **3** 51
- [20] Jones M I, McColl I R, Grant D M, Paker K G, Paker T L 2000 *Biomed. Mater. Res.* **52** 413
- [21] Cui F Z, Li D J 2000 *Surf. Coat. Technol.* **131** 481
- [22] Li B G, Yin J, Na J J, Yin G F, Zheng C Q 2005 *Biomed. Eng.* **22** 20 (in Chinese) [李伯刚、殷杰、那娟娟、尹光福、郑昌琼 2005 生物医学工程学杂志 **22** 20]
- [23] Jiang M F, Ning Z Y 2006 *Surf. Coat. Technol.* **200** 3682
- [24] Jiang M F, Ning Z Y 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 1588 (in Chinese) [江美福、宁兆元 2004 物理学报 **53** 1588]
- [25] Takada N, Shibagaki K, Kadota K, Oyama K I 2001 *Vac. Sci. Technol. A* **19** 689
- [26] Wang X, Harris H R, Bouldin K, Temkin H, Gangopadhyay S 2000 *J. Appl. Phys.* **87** 621
- [27] Yokomichi H 1999 *J. Appl. Phys.* **86** 2468
- [28] Huang S, Xin Y, Ning Z Y 2002 *Acta Phys. Sin.* **51** 2635 (in Chinese) [黄松、辛煜、宁兆元 2002 物理学报 **51** 2635]
- [29] Ishihara M, Kosaka T, Nakamura T, Tsugawa K, Hasegawa M, Kokai F, Koga Y 2006 *Diamond Relat. Mater.* **15** 1011

Influence of source gas flow ratio on the proteins adsorbability of F-DLC film

Dai Yong-Feng Jiang Mei-Fu[†] Yang Yi-Shang Zhou Yang

(Department of Physics, Soochow University, Suzhou 215006, China)

(Received 17 December 2010; revised manuscript received 19 January 2011)

Abstract

The fluorinated diamond-like carbon (F-DLC) films are prepared by reactive magnetron sputtering under different gas flow ratios with trifluoromethane (CHF_3) and argon (Ar) used as source gases and pure graphite as a target on the surface of 316L stainless steel (SU316L). Factors which influence the protein adsorbability are discussed by double-stilled water, BCA and FTIR spectra. The results show that the surface of SU316L coated with F-DLC film could obviously reduce the number of adherent platelets and dramatically relieves the deformation of platelets, leading to a ratio of higher albumin to fibrinogen adsorption higher than that with using the SU316L substrates, which indicates that the SU316L coated with F-DLC film can improve the blood compatibility. The film has the highest ratio of albumin to fibrinogen adsorption and the best hemocompatibility when the ratio of gas flow is 2:1. Furthermore, the measurements of the contact angle, the surface energy of films and FTIR spectra show that the ratio of albumin to fibrinogen adsorption and the hemocompatibility of F-DLC coated SU316L depend on the surface energy (hydrophobic nature) of films and the quantity of $-\text{CF}_x$ bonds (the ratio of F/C) contained in film. The modulating of blood compatibility of the films can be realized by the control of the ratio of source gas flow.

Keywords: reactive magnetron sputtering, F-DLC films, proteins adsorbability

PACS: 81.05.Uw, 81.15.Cd, 87.15.kt

[†] Corresponding author. E-mail: dxwlb@suda.edu.cn