

文章编号: 0258 7025(2009) 10· 2625 04

# 脉冲激光沉积类金刚石膜和细胞相容性研究

罗乐<sup>1</sup> 夏天荣<sup>1</sup> 方晓东<sup>2</sup> 严中亚<sup>3</sup> 程光存<sup>3</sup>

{<sup>1</sup> 合肥工业大学应用物理系, 安徽 合肥 230009; <sup>2</sup> 中国科学院安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031  
<sup>3</sup> 安徽省立医院胸心外科, 安徽 合肥 230001}

**摘要** 为了解决机械瓣膜的凝血问题, 在相同的实验条件下, 用脉冲激光沉积 (PLD) 法在机械瓣膜,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 316 L 不锈钢和 Si 衬底上沉积类金刚石 (DLC) 膜, 结果表明类金刚石膜与机械瓣膜之间的黏附性最好。用拉曼光谱仪 (Raman), X 射线光电子能谱仪 (XPS) 和原子力显微镜 (AFM) 对机械瓣膜上的类金刚石膜进行检测, 然后把人脐带静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 种植在类金刚石膜的表面并进行体外培养。结果表明, Raman 光谱的 D 峰出现在  $1341.66\text{ cm}^{-1}$  处, G 峰出现在  $1528.17\text{ cm}^{-1}$  处。薄膜中  $\text{sp}^3$  的含量达到 21.45%。平均粗糙度为 26.4 nm。血管内皮细胞能够正常生长、增殖并融合成片, 因此可以实现机械瓣膜表面的血管内皮化, 达到抗凝的目的。

**关键词** 激光技术; 脉冲激光沉积法; 类金刚石膜; 机械瓣膜; 黏附性; 细胞相容性

中图分类号 TN249: R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2625

## Experiment of Diamond-Like Carbon Film Deposited by Pulsed Laser and Cell Compatibility of Diamond-Like Carbon Film

Luo Le<sup>1</sup> Xia Tianrong<sup>1</sup> Fang Xiaodong<sup>2</sup> Yan Zhongya<sup>3</sup> Cheng Guangcun<sup>3</sup>

{<sup>1</sup> Applied Physics Department, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009, China

<sup>2</sup> Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China

<sup>3</sup> Department of Cardiac Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui 230001, China

**Abstract** The experiment was to avoid thrombus on the surface of the mechanical heart valve. Firstly diamond like carbon (DLC) films were deposited on the mechanical heart valve,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 316 L stainless steel and silicon substrates by the pulsed laser deposition (PLD) at same experiment condition. The result demonstrated that diamond like carbon film exhibited the best adhesion to the mechanical heart valve. Secondly the structure and composition and topography of diamond like carbon film on the mechanical heart valve were measured by the visible Raman spectroscopy and the X ray photoelectron spectroscopy (XPS) and the atomic force microscopy (AFM). Finally human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) were seeded on diamond like carbon film on the mechanical heart valve and cultured in vitro. Raman spectroscopy revealed that disorder peak was at  $1341.66\text{ cm}^{-1}$  and graphite peak was at  $1528.17\text{ cm}^{-1}$ . XPS spectroscopy revealed that there was 21.45% of  $\text{sp}^3$  in the film. AFM revealed that the roughness average of the film was 26.4 nm. Human umbilical cord vein endothelial cells could proliferate on diamond like carbon film very well. The result demonstrated that diamond like carbon film on the mechanical heart valve deposited by pulsed laser deposition had good cell compatibility and could be covered with human umbilical cord vein endothelial cells fully so that it is possible to avoid thrombus on the surface of the mechanical heart valve.

**Key words** laser technique; pulsed laser deposition; diamond like carbon film; mechanical heart valve; adhesion; cell compatibility

## 1 引言

由热解碳 (Low-temperature isotropic pyrolytic

carbon, LTIC) 制成的机械瓣膜是临床应用最多的一种人工心脏瓣膜, 具有经久耐用等优点, 最大的缺

收稿日期: 2008-11-18; 收到修改稿日期: 2009-02-24

基金项目: 中国科学院“百人计划”和合肥工业大学博士基金 (GDBJ2008043) 资助项目。

作者简介: 罗乐 (1963—), 男, 博士, 副教授, 主要从事激光技术及其应用方面的研究。E-mail: luolehfut@sohu.com

点是表面出现凝血<sup>[1]</sup>,因此解决机械瓣膜的凝血问题具有重要意义和经济价值。由于类金刚石膜(Diamond like carbon, DLC)具有很高的化学稳定性、很小的摩擦系数和良好的生物相容性,被广泛用于人工移植物的表面改性<sup>[2-4]</sup>。但是,由于类金刚石薄膜和衬底之间的黏附性较差,当薄膜沉积到一定厚度时容易起皱和脱落<sup>[5-7]</sup>,因此限制了类金刚石薄膜的临床应用。

脉冲激光沉积(Pulsed laser deposition, PLD)法是利用脉冲激光巨大的功率密度使固体靶材在瞬间被气化电离,在靶材表面的法线方向上形成等离子体羽辉,当等离子体羽辉碰撞到衬底时,在衬底表面沉积成膜。脉冲激光沉积法具有许多独特的优点,被广泛地应用于各种功能薄膜、梯度膜或多层膜的制备与研究<sup>[8-11]</sup>。在医学领域,主要利用脉冲激光沉积法在各种医用材料上制备各种类金刚石薄膜,以提高人工移植物表面的生物相容性<sup>[12-15]</sup>。

本文采用热解碳制作的机械瓣膜作衬底,用脉冲激光沉积法制备类金刚石膜,以解决薄膜与衬底之间的黏附性问题。同时,把机械瓣膜上的类金刚石薄膜作为过渡层,在它的表面种植人脐带静脉血管内皮细胞(Human umbilical cord vein endothelial cell, HUVEC)并进行体外培养,以便在机械瓣膜表面形成一层人的血管内皮层。由于正常的人体血管内皮层具有很好的抗凝性能,因此只要在机械瓣膜表面实现人体血管内皮化,就可以彻底解决机械瓣膜表面的凝血问题。

## 2 实 验

实验采用 PLD-301 型脉冲激光沉积装置(日本);采用热解碳机械瓣膜, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 316 L 医用不锈钢和 Si 作衬底。在沉积之前,对各种衬底进行丙酮超声清洗 10 min,去离子水超声清洗 2 min,去除丙酮残留液,并用 N<sub>2</sub> 气吹干。在沉积过程中,采用纯度为 99.99% 的石墨圆片(直径 20 mm,厚 2 mm)作靶材,靶材与衬底之间的距离为 2.50 cm。主腔的真空度为  $2.83 \times 10^{-5}$  Pa。脉冲激光采用波长为 248 nm 的 KrF 准分子激光,脉冲能量 150 mJ,输出频率 5 Hz。4 种衬底的温度都控制在 30 °C。机械瓣膜的沉积时间分别取 15 min, 40 min 和 50 min。Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的沉积时间分别取 15 min 和 40 min。Si 的沉积时间分别取 15 min 和 40 min。316 L 医用不锈钢的沉积时间分别取 15 min 和 40 min。采用光学显微镜观察薄膜表面情况。

采用 LABRAM-HR 型 Raman 光谱仪和 ESCALAB 250 型 X 射线光电子能谱仪(XPS)对沉积在机械瓣膜上的类金刚石薄膜(沉积时间为 40 min 的样品)的微观结构与组成进行检测。采用 CSPM 3400 型原子力显微镜(AFM)对沉积在机械瓣膜上的类金刚石膜(沉积时间为 40 min 的样品)的表面形貌和粗糙度进行检测。

将传代的人脐带静脉血管内皮细胞制成细胞悬液,在培养板(美国 Corning 公司生产)中接种在类金刚石薄膜(沉积时间为 40 min 的样品)上,放置在体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub>, 37 °C 的恒温培养箱内静态培养,并在倒置显微镜(美国 Leica 公司)下观察 HUVEC 细胞在类金刚石膜表面的附着、增殖和生长发育情况。

## 3 实验结果与分析

沉积时间为 15 min 时,在 4 种衬底上沉积的薄膜都没有出现起皱现象。当沉积时间增加到 40 min 时,沉积在 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 316 L 医用不锈钢衬底上的薄膜从真空室中取出后就出现起皱并和衬底剥离的现象,沉积在 Si 衬底上的薄膜一周后也出现起皱并和衬底剥离的现象,沉积在机械瓣膜衬底上的薄膜则始终都没有出现起皱的现象。当沉积时间增加到 50 min 时,沉积在机械瓣膜衬底上的薄膜仍然没有出现起皱的现象。当沉积时间取 40 min,机械瓣膜衬底温度升高到 150 °C 时,沉积在机械瓣膜衬底上的薄膜也没有出现起皱的现象。这些现象表明沉积在机械瓣膜衬底上的薄膜的黏附性最好。

类金刚石膜与衬底之间的黏附性主要和薄膜内的残留应力、薄膜与衬底之间的化学键、薄膜的厚度等因素有关。由于 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 316 L 医用不锈钢和 Si 衬底与类金刚石薄膜的热膨胀系数不同,薄膜内会产生较大的残留应力,并且随着薄膜厚度的增大而增大,因此当薄膜沉积到一定厚度时(沉积时间 40 min)就会起皱和脱落。在机械瓣膜上沉积类金刚石薄膜时,由于薄膜与衬底都是由碳元素组成的,它们的热膨胀系数相近,因此可以有效地减小薄膜内的残留应力。与此同时,由于短波长、大功率密度的 KrF 准分子激光所产生的碳离子具有很高的能量,撞击到热解碳衬底中,不仅等离子体羽辉中的碳离子能够相互结合形成化学键,而且也可能和衬底中的碳原子形成化学键合。因此在机械瓣膜上沉积的类金刚石膜具有很好的黏附性。

在机械瓣膜上所沉积薄膜的 Raman 光谱如图

1 所示。对图 1 的 Raman 光谱进行高斯分解后可以 看出: D (disorder) 峰出现在  $1341.66\text{ cm}^{-1}$  处, G (graphite) 峰出现在  $1528.17\text{ cm}^{-1}$  处,  $I_D/I_G = 1.033$ 。Raman 谱是研究碳膜结构最常用的方法, 在类金刚石膜的 Raman 谱中, G 峰一般位于  $1550\text{ cm}^{-1}$  处, D 峰位于  $1350\text{ cm}^{-1}$  处。如果 G 峰向 低频方向移动, 则对应变形的  $sp^2$  键和  $sp^3$  键含量 增加。如果 G 峰和 D 峰同时向低频方向移动, 则表 明薄膜中  $sp^3$  键含量增加。从图 1 中可以看出, 沉 积在机械瓣膜上的类金刚石薄膜的 G 峰和 D 峰同 时向低频方向移动。

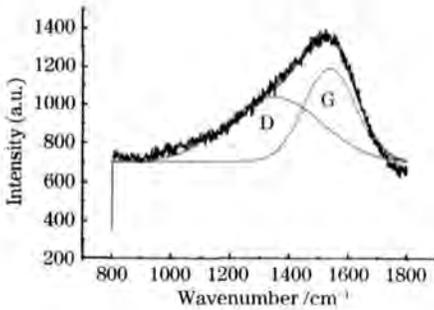


图 1 沉积在机械瓣膜上的类金刚石膜的 Raman 光谱  
Fig.1 Raman spectra of DLC film deposited on mechanical valve

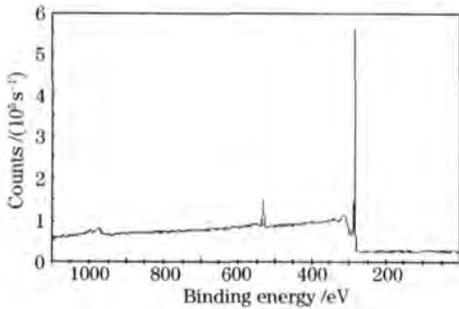


图 2 沉积在机械瓣膜上的类金刚石薄膜的 XPS 全谱图  
Fig.2 XPS spectra of DLC film deposited on mechanical valve

图 2 是沉积在机械瓣膜上的类金刚石膜的 XPS 全谱图, 图 3 是 XPS 谱图中  $C_{1s}$  电子能谱图。从图 2 和图 3 中可以看出薄膜主要由 C 元素组成, 并含有少量的 O 元素和微量的 H 元素。由于在 XPS 的测量中, 类金刚石薄膜中的  $sp^3$  和  $sp^2$  包含在  $C_{1s}$  电子能谱图中, 因此通过对  $C_{1s}$  电子能谱进行解谱分析可知  $sp^3$  和  $sp^2$  的含量。通过对图 3 进行解谱分析可知, 薄膜中含有 21.45% 的  $sp^3$ ; 61.73% 的  $sp^2$  和 G-C; 6.31% 的 G-O; 2.90% 的 C=O 和

1.18% 的 COOH。

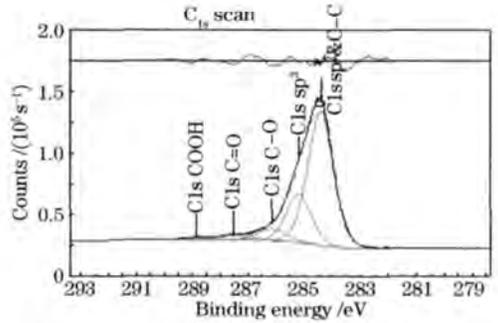


图 3 XPS 中的  $C_{1s}$  电子能谱图  
Fig.3  $C_{1s}$  spectra of DLC film XPS spectra

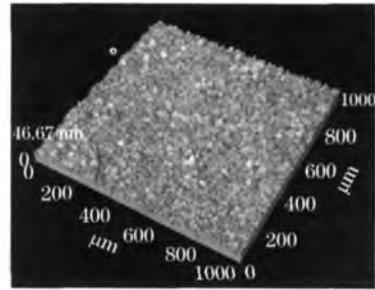


图 4 类金刚石膜表面形貌的原子力显微镜图像  
Fig.4 Topography AFM image of DLC

图 4 是沉积在机械瓣膜上的类金刚石薄膜表面形貌的原子力显微镜图像。扫描范围为  $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ , 通过分析计算可得薄膜表面的粗糙度参数为:  $S_a$ (平均粗糙度) = 26.4 nm,  $S_q$ (均方根值) = 33.8 nm。

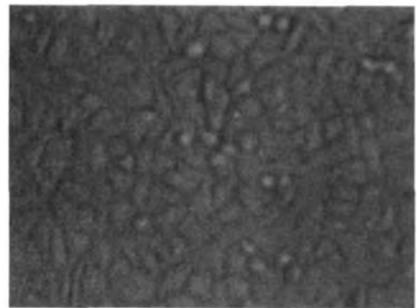


图 5 培养 7 天后的人脐带静脉内皮细胞  
Fig.5 HUVEC cultivated after 7 days

把人脐带静脉血管内皮细胞种植在类金刚石膜上进行体外培养和观察, 当培养到第 7 天时类金刚石膜表面已有大量的细胞附着、增殖并融合成片, 如图 5 所示。这说明沉积在机械瓣膜上的类金刚石膜具有良好的细胞相容性, 血管内皮细胞可以在它的表面形成一层血管内皮细胞层, 从而可以实现人工机械瓣膜表面的血管内皮化。

## 4 结 论

采用脉冲激光沉积法在热解碳机械瓣膜上可以沉积出类金刚石膜,并且类金刚石薄膜与热解碳衬底之间具有很好的黏附性。与此同时,人脐带静脉血管内皮细胞能够在类金刚石薄膜表面很好地生长、增殖并融合成片,从而实现人工心脏机械瓣膜表面的血管内皮化,达到抗凝血的目的。

## 参 考 文 献

- 1 N. Ali, Y. Kousar, T. I. Okpalugo *et al.*. Human microvascular endothelial cell seeding on Cr-DLC thin films for mechanical heart valve applications[J]. *Thin Solid Films*, 2006, **515**(1): 59~ 65
- 2 S. C. H. Kwok, P. C. T. Ha, D. R. McKenzie *et al.*. Biocompatibility of calcium and phosphorus doped diamond like carbon thin films synthesized by plasma immersion ion implantation and deposition[J]. *Diamond Relat. Mater.*, 2006, **15**(4-8): 893~ 897
- 3 Roger J. Narayan. Nanostructured diamond like carbon thin films for medical applications [J]. *Mater. Sci. Eng. C*, 2005, **25**(3): 405~ 416
- 4 Geoffrey Dearnaley, James H. Arps. Biomedical applications of diamond like carbon (DLC) coatings: A review[J]. *Surf. Coat. Technol.*, 2005, **200**(7): 2518~ 2524
- 5 L. F. Bonetti, G. Capote, L. V. Santos *et al.*. Adhesion studies of diamond like carbon films deposited on Ti6Al4V substrate with a silicon interlayer[J]. *Thin Solid Films*, 2006, **515**(1): 375~ 379
- 6 Roger Jagdish Narayan. Pulsed laser deposition of functionally gradient diamond like carbon metal nanocomposites[J]. *Diamond Relat. Mater.*, 2005, **14**(8): 1319~ 1330
- 7 Bai Ting, Ye Jingfeng, Liu Jingru *et al.*. Pulsed excimer laser deposited diamond like carbon film on ZnS with wide spectral transmission[J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(7): 992~ 997
- 8 P. M. Ossi, C. E. Bottani, A. Miotello. Pulsed laser deposition of carbon: from DLC to cluster assembled films[J]. *Thin Solid Films*, 2005, **482**(1-2): 2~ 8
- 9 Yang Yifa, Long Hua, Yang Guang *et al.*. Effect of temperature on structure and properties of femtosecond laser deposited silicon based zinc oxide thin film[J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(9): 1282~ 1286
- 10 Wang Yanmin, Meng Haiwei, Wang Yan *et al.*. Dielectric and optical properties of Ba<sub>0.5</sub>Sr<sub>0.5</sub>TiO<sub>3</sub> thin films fabricated by pulsed laser deposition[J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(4): 804~ 808
- 11 Zhu Jie, Xie Kang, Zhang Hui *et al.*. Influence of deposition temperature on growth orientation of PZT/LSAT thin film[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9): 1384~ 1387
- 12 A. S. Loir, F. Garrelie, C. Donnet *et al.*. Towards the deposition of tetrahedral diamond like carbon films on hip joints by femtosecond pulsed laser ablation[J]. *Surf. Coat. Technol.*, 2004, **188-189**: 728~ 734
- 13 S. Logothetidis, M. Gioti, S. Lousinian *et al.*. Haemocompatibility studies on carbon based thin films by ellipsometry[J]. *Thin Solid Films*, 2005, **482**(1-2): 126~ 132
- 14 R. Hauert. A review of modified DLC coatings for biological applications[J]. *Diamond Relat. Mater.*, 2003, **12**(3-7): 583~ 589
- 15 W. Okrój, M. Kamińska, L. Klimek *et al.*. Blood platelets in contact with nanocrystalline diamond surfaces [J]. *Diamond Relat. Mater.*, 2006, **15**(10): 1535~ 1539