

文章编号:1004-7220(2017)06-0513-06

冲击载荷作用下蛋白质水溶液润滑吸附膜的生长特性

马龙华, 刘海超, 郭峰, 姜培刚

(青岛理工大学 机械工程学院, 青岛 266520)

摘要: **目的** 研究蛋白质水溶液挤压润滑条件下材料表面蛋白质吸附膜的动态生长特性及其影响因素。**方法** 利用光干涉技术测量球盘点接触在循环冲击条件下 BSA 蛋白质水溶液的吸附膜厚的生长过程,并研究冲击载荷、冲击次数、材料表面性质对 BSA 水溶液的吸附成膜特性的影响。**结果** 动态条件下蛋白质润滑吸附膜要比静态工况下的升高很多,冲击条件下蛋白质吸附膜不断生长,并最终达到稳定厚度。小载荷和疏水材料表面有利于蛋白质润滑吸附膜的生长。钢表面极易形成较厚吸附膜,而陶瓷表面吸附膜厚较低。**结论** 针对冲击载荷作用下蛋白质水溶液润滑吸附膜的生长特性研究对人工关节磨损、松动等的治疗、预防具有一定的临床指导意义。

关键词: 冲击润滑; 蛋白质吸附; 润滑膜厚; 光干涉

中图分类号: Q 816 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.06.005

Evolution of lubricating adsorption films with protein aqueous solution under impact loads

MA Long-hua, LIU Hai-chao, GUO Feng, JIANG Pei-gang (School of Mechanical Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao 266520, China)

Abstract: Objective To study the dynamic growth of adsorption films on solid surfaces in point contacts with aqueous protein aqueous solutions and investigate the dominating factors. **Methods** The formation of the adsorption films within a ball-on-disc contact was measured using optical interference technique. The effects of impact loads, impact times and surface properties of the materials on the adsorption of BSA aqueous solution were also studied. **Results** Under dynamic conditions, the thickness of the adsorption film was much higher than that under static condition. The adsorption film was growing with increasing impact times and finally the stable thickness could be achieved. Small loads and hydrophobic materials were favorable for the growth of the adsorption film. The BSA adsorption film was easy to grow on the steel surface, but on the ceramic surface the adsorption film thickness was low. **Conclusions** The research about adsorbed lubricating films evolution of protein aqueous solution under impact loads is of clinical significance for treating and preventing of artificial prosthesis.

Key words: Impact lubrication; Protein adsorption; Lubrication film thickness; Interferometry

目前人工关节的置换已相当普遍,植入部位一般是在功能性和活动性很强的承重关节,如膝关节和髋关节。全球每年单纯髋关节的置换量超过 100 万例,膝关节的置换量则更多^[1]。据统计,全球 82% 全关节置换的寿命达到 10 年^[2],这极大提高了

患者的生活质量;但是较活跃年轻患者的成功率下降到 72% (一般要求寿命达到 10~20 年)。临床失效形式有超高分子量聚乙烯关节的磨屑和骨溶解、金属关节的腐蚀磨损和假性肿瘤、陶瓷关节的异响等,这些现象都与关节接触表面的润滑和磨损等机

收稿日期:2017-01-14; 修回日期:2017-03-27

基金项目:教育部博士点基金(20133721110002)。

通信作者:郭峰,教授, E-mail: mefguo@163.com。

械-生物摩擦学因素密切相关。因此,生物摩擦学的研究能够指导人工关节的设计,有助于提高人工关节的工作性能和使用寿命。

人工关节的生物摩擦学研究主要集中在对偶副材料选择和尺寸设计^[3]、摩擦腐蚀与关节表面改性^[4]、润滑剂配方和磨损性能评价^[5]、磨损模型建立^[6]。已有的大量实验研究基本均在材料通用摩擦磨损试验机或专用的人工关节磨损试验机^[7]上完成,重点考察材料的磨损量和开展摩擦分析,总体上认为蛋白质在关节面的吸附对降低摩擦起重要作用^[8-9]。

但从润滑和成膜机制角度进行人工关节摩擦学研究的报道很少。众所周知,润滑是降低摩擦、避免或者降低磨损的最有效手段,从润滑和关节摩擦面成膜机制角度开展研究十分有意义,但遗憾的是国内鲜有关于关节液中蛋白质吸附对润滑膜厚影响的研究报告发表。Mavraki等^[10]采用球盘接触油膜测量试验机,观测到牛血清白蛋白和球蛋白溶液在运动状态下可形成足够厚的润滑膜将两个表面彻底分开,润滑膜厚随着速度变化不明显,且速度增加润滑膜厚反而降低;但载荷对润滑膜的影响十分明显,而经典的弹性流体动压膜厚对载荷变化并不敏感,故作者认为人工关节润滑机制不能用传统的润滑理论解释,这些现象是由蛋白质吸附膜和流体膜综合作用造成的,并进一步研究提出接触区入口蛋白质堆积的成膜机制^[11]。随后,有研究者采用类似的球盘膜厚测量装置对牛血清溶液在不同滑动、滚动接触以及不同亲疏水表面接触情况下的膜厚进行测量分析^[12-13]。

但是在上述研究中,测量的膜厚都是蛋白质吸附膜厚和动压形成的流体膜厚之和,很难提取吸附膜的厚度。实际情况下的人体关节运动形式非常复杂,但其基本的运动呈现周期性,需要承受诸如走路等周期性的冲击载荷^[14],而目前尚不清楚该类载荷对关节滑液润滑性能的影响。因此,本文针对这类问题,利用自行设计的球盘光干涉润滑膜厚测量试验机,在冲击载荷和牛血清白蛋白水溶液润滑条件下观测单纯蛋白质吸附膜厚,进而研究润滑吸附膜在不同工况下(关节配偶材料、载荷大小和频率、溶液浓度等)的生长特性。

1 测量装置与原理

所用球盘接触润滑膜厚测量试验机如图1所示,用球-玻璃盘的接触形式模拟关节的接触。设计的加载装置可控制球周期性冲击玻璃盘,球盘接触区内蛋白质吸附膜厚度的变化通过实验室新开发的双色光干涉技术^[15](dichromatic interference intensity modulation approach, DIIM)进行测量,可避免单色光的级次混淆,分辨率为1 nm。具体地,入射光在玻璃盘下表面和钢球上表面(即接触区蛋白质薄膜的上下表面)反射后叠加形成干涉图像。CCD相机不断捕捉经显微镜放大的膜厚干涉图像,并传输给计算机图像处理软件,最终由干涉图像的光强和色彩求得接触区内蛋白质的膜厚。本文中给出的膜厚均为球盘接触区中心截面膜厚的平均值。其中,入射光源红、绿激光的波长分别为635、532 nm。该试验机球和盘分别由两个伺服电动机驱动,可以实现纯滚动、滑动等多种运动形式,但在本文冲击载荷研究中球和盘均无需旋转。

周期冲击载荷的控制原理为:首先通过拉力计在球和玻璃盘之间施加所需载荷,然后通过伺服电动机带动压板销压在加载托板上,使钢球和玻璃盘分离约0.25 mm,此时球和盘之间的载荷变为0。当控制压板销离开加载板时,球和盘便会恢复原设定载荷。通过伺服电动机控制便可很容易调节冲击载荷的周期和频率。

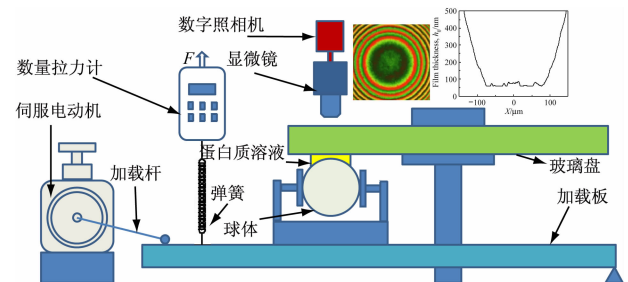


图1 球盘接触冲击试验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the ball-on-disk setup with impact loads

图2所示为冲击载荷周期性加载-卸载波形图。参考人体膝关节的受力情况,在一个步态周期内膝关节受力和不受力时间的比例约为9:5^[16],故设定一个冲击频率下受力时间占9/14,不受力时间占

5/14。根据日常运动情况设定冲击循环周期为 1.4 s,为了模拟行动缓慢的人群又选择 2.8 s 的周期。设定载荷为 2 和 4 N。

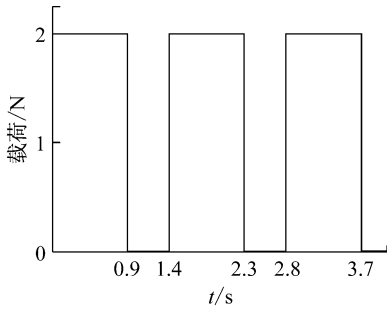


图2 周期性冲击载荷梯形图(周期 1.4 s)
 Fig.2 Illustration of the periodic impact load

2 试样材料与溶液

球盘接触中玻璃盘材料为 K9 光学玻璃。为得到高对比度的干涉图像,工作面镀有析光 Cr 膜,表面粗糙度 Ra 约为 4 nm。为考察表面亲疏水性对蛋白质吸附膜厚的影响,玻璃盘在 Cr 膜的基础上镀有 SiO₂ 膜。目前实验所用的球的材料有 GCr15 轴承钢球和 Si₃N₄ 陶瓷球两种,直径均为 25.4 mm。轴承钢的弹性模量为 206 GPa,泊松比为 0.30;氮化硅陶瓷球的弹性模量为 310 GPa,泊松比为 0.26。

天然的人体关节滑液成分复杂,包括水、透明质酸、蛋白质、蛋白聚糖和一些脂类等,其中白蛋白是含量最多的蛋白质组份。研究发现,蛋白质对关节润滑起重要作用^[8-9],故选用牛血清白蛋白 BSA (北京华迈科生物技术有限责任公司)。实际上,BSA 也是吸附科学实验中最常采用的标准蛋白,因为其分子结构已经被很好地表征^[18],且在水中溶解性好。溶剂为去离子水,配置的 3 种 BSA 水溶液浓度分别为 20、30、40 mg/mL,无其他添加剂。配制好的溶液放在 5 °C 冰箱中冷藏以防止变质,并在 7 d 内使用。为进行对比实验,在实验温度为 20 °C 下配置两种类似黏度的甘油水溶液,参数见表 1。

3 实验结果

测量动静态、载荷大小和频率、关节对偶材料、溶液浓度等不同条件下 BSA 蛋白质吸附膜的厚度和生长过程。

表 1 实验所用溶液的性质

Tab.1 Properties of solutions used in the experiment

溶液	折射率	黏度/(mPa·s)
20 mg/mL BSA	1.34	1.16
30 mg/mL BSA	1.36	1.26
40 mg/mL BSA	1.37	1.50
甘油 1	1.37	1.38
甘油 2	1.37	2.46

3.1 动静态对比试验

图 3 给出动静态条件下接触区沿中心截面所吸附蛋白质膜厚(h)的对比结果。静态试验中,钢球在无载荷、无冲击条件下浸泡在 BSA 溶液中 6 min,然后加载至 2 N 测量接触区蛋白质吸附膜厚。动态试验中,钢球以 2 N 循环冲击玻璃盘 6 min,周期 2.8 s后再测量接触区的吸附膜厚。动态冲击条件下,蛋白质吸附膜厚度能达到 70 nm,远高于静态下的 10 nm。因此,动态循环冲击作用会促进蛋白质吸附膜的生长,但不同蛋白质溶液浓度对吸附膜厚的影响很小。从图 3 中曲线波动也可以看出,静态吸附的蛋白质膜在接触区的分布相对均匀,而动态冲击吸附的膜分布不太均匀。

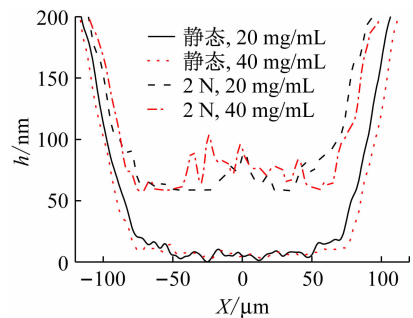


图3 静态和动态循环冲击下不同浓度 BSA 水溶液吸附膜厚对比图
 Fig.3 BSA film formation at different concentrations under static and dynamic cyclic impacts

3.2 冲击次数对蛋白质吸附膜厚的影响

测量不同冲击次数下接触区中心截面吸附膜厚的分布。随着冲击次数增加(即试验时间增加),吸附膜厚也在增加,由此证明冲击能促进 BSA 吸附膜的生长。当达到一定冲击次数(此工况为 75 次),膜厚会达到一个峰值,约 70 nm,并就此趋于稳定。

值得注意的是,冲击条件下膜厚的增高有可能

是蛋白质的吸附作用,还有可能是冲击封油^[19]造成的结果。通常来说,润滑剂黏度越大,对应的冲击封油膜厚越高。为此配制与3种浓度BSA水溶液黏度相近似的甘油水溶液,并测量冲击载荷下的膜厚,对比结果如图4所示。BSA水溶液的成膜要远高于甘油水溶液的膜厚,由此可确定冲击下膜厚的增长是由于BSA蛋白质分子的吸附作用,而不是冲击封油造成的。3种不同浓度BSA水溶液的成膜特性非常相似,浓度对BSA水溶液的吸附性能影响很小。对比两种频率下的膜厚发现,相同时间下周期1.4 s的冲击次数是周期2.8 s的2倍,故周期1.4 s下的成膜速度要比周期2.8 s的快,但是两者在达到一定冲击次数后膜厚都能达到一个稳定值。

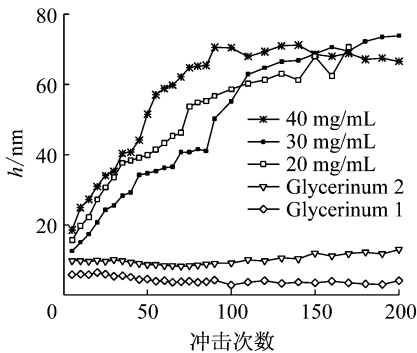


图4 甘油水溶液和BSA水溶液的膜厚对比

Fig. 4 Comparison of adsorption film thickness for glycerol solutions and BSA solutions

3.3 材料对蛋白质吸附膜厚的影响

目前用于人工关节的材料主要包括CoCrMo、316 L等金属、UHMWPE聚乙烯和陶瓷^[20]。图5测量对比了金属钢球和Si₃N₄陶瓷球在40 mg/mL BSA水溶液中的蛋白质吸附膜厚。金属钢球的蛋白质吸附膜厚整体高于陶瓷球。随着冲击次数增加,钢球的蛋白质吸附厚度会趋于稳定(70 nm),但多次重复试验均显示陶瓷球在冲击作用下形成的蛋白质吸附膜厚浮动更大,甚至随着冲击次数增多,有略微下降趋势。整体上金属钢球吸附蛋白质膜厚是陶瓷球的2~3倍。实验所用玻璃盘的工作面有SiO₂和Cr膜两类,两者呈现不同的亲疏水性。镀Cr玻璃盘呈现疏水性,而表面镀SiO₂盘呈现亲水性^[13]。图5所示为陶瓷球冲击下Cr膜玻璃盘和镀SiO₂膜玻璃盘的吸附膜厚对比。冲击前期阶段,镀

Cr玻璃盘的吸附膜厚比镀SiO₂玻璃盘的膜厚升高了约5 nm,说明BSA水溶液在疏水界面下的吸附要比亲水界面下的要好。当冲击次数足够多时,陶瓷球对SiO₂膜的对偶面无法形成稳定厚度的蛋白质吸附膜,而陶瓷球对金属Cr膜的对偶面却可以形成稳定的吸附膜厚,约为35 nm,这个厚度小于钢球对SiO₂膜对偶面产生的稳定的70 nm膜厚。

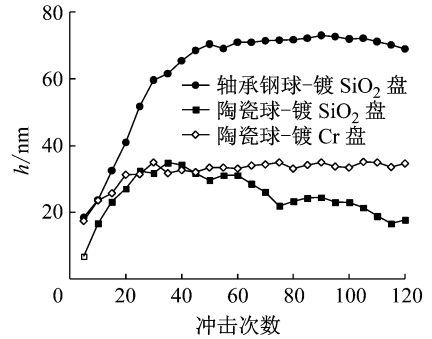


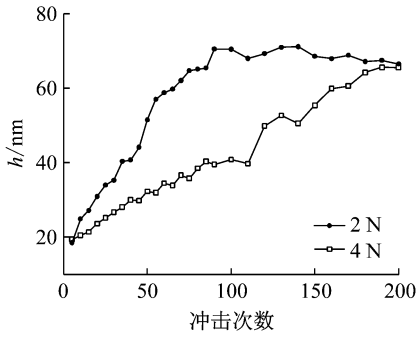
图5 冲击载荷下不同材料和表面的蛋白质吸附膜厚对比图

Fig. 5 Adsorption of BSA film thickness with different materials and surfaces

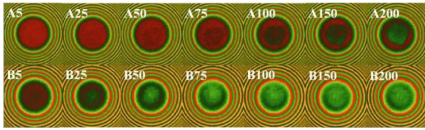
3.4 冲击载荷对蛋白质吸附膜厚的影响

通过计算,在2 N冲击载荷下,轴承钢球、氮化硅陶瓷球最大赫兹接触压力分别为218.1、232.2 MPa;在4 N冲击载荷下,轴承钢、氮化硅陶瓷球最大赫兹压力分别为274.4、292.5 MPa。

图6(a)所示为2、4 N冲击载荷下钢球和镀SiO₂玻璃盘接触区的膜厚对比结果。通过拟合曲线算出,2、4 N冲击载荷下膜厚增长的斜率分别为0.641、0.243。由此可见,较大载荷影响关节接触面的成膜速度,不利于有效润滑。通过图6(b)采集的接触区光干涉图像,可以更加直观地观察不同冲击载荷对蛋白质成膜的影响。干涉图中心圆环为球盘接触的弹性变形区,即最需要润滑膜的地方。中心接触区干涉颜色和光强的变化反映了蛋白质膜厚的生长变化,绿色代表高膜厚,红色代表低膜厚。随着冲击次数增加,蛋白质膜在从中心开始往外围不断生长并逐渐充满整个接触区,从而避免关节两表面的直接接触摩擦,起到润滑保护和一定缓冲作用。低冲击载荷作用下蛋白质膜厚生长更快,2 N载荷下第75次冲击时膜厚就能布满整个接触区。



(a) 不同冲击载荷下膜厚对比



(b) 光干涉图(A-4 N,B-2 N)

图6 冲击载荷对蛋白质吸附膜厚的影响

Fig.6 Influence of impact loads on absorption film thickness

- (a) Adsorption film thickness under different impact loads,
- (b) Interferograms of the growing BSA films

4 讨论

本文通过球盘接触实验装置模拟日常活动中人工关节在循环载荷变化下的接触形式,利用光干涉技术测量冲击载荷作用下 BSA 水溶液的润滑吸附特性,从而获取实际关节润滑中蛋白质的作用机制。通过对比实验排除了冲击封油的影响,可以认为所测量的膜厚是单纯的蛋白质吸附膜厚,并对比动、静态工况下不同冲击次数、频率和载荷以及材料与表面润湿性对蛋白质吸附生长的影响。

蛋白质分子在固体表面的吸附是一个十分常见但也极其复杂的现象。采用单一的 BSA 蛋白质,配置的溶液 pH 为 6.8,大于 BSA 的等电点 4.7^[21],此时 BSA 带负电而彼此相斥。溶液中 BSA 分子要想在固液界面吸附,其主要作用力是疏水作用力和静电作用力。金属钢球在 BSA 溶液中也呈负电性^[22],这样就决定了静止实验条件下钢球表面吸附蛋白质膜厚较少。但冲击过程中的剪切和压力作用会将 BSA 分子内部疏水基团暴露出来,因疏水作用而增加了蛋白质在表面的吸附^[23]。Ortega-Vinuesa 等^[24]也观察到动态剪切条件下蛋白质在表面吸附的厚度比静态时增加的现象。

在一定浓度范围内,BSA 溶液浓度对最终吸附

膜的厚度影响很小,但不同载荷对 BSA 吸附膜厚的影响却很明显,大载荷会使蛋白质遭受更大的剪切作用,但也会产生更强的侧泄效应,从而影响蛋白质的吸附。此外,大载荷也会对已产生的吸附膜造成破坏。本文通过实验证明了 BSA 更倾向于吸附在疏水界面上,这是由于受力变性的蛋白质疏水键会更多暴露出来,极易吸附在疏水材料上。BSA 在金属材料上的吸附量远高于陶瓷材料,主要是因为蛋白质在两种材料上的吸附构象不同。中性 pH 值溶液中陶瓷材料表面带正电荷并且呈现亲水性^[8],此时带负电的 BSA 分子会直接吸附在陶瓷表面上,从而抑制了蛋白质分子的再吸附;若没有其他作用力,则通常会呈现单分子层吸附的状态。

5 结论

本文采用球盘光干涉膜厚测量试验机研究冲击载荷作用下 BSA 蛋白质在接触区内的生长吸附特性,得到的结论如下:

- (1) 球盘接触润滑膜测量试验台结合光干涉技术,可以有效测量蛋白质水溶液在材料表面的润滑吸附膜厚度,这也为从润滑角度研究人工关节材料和合成润滑剂检测提供了新方法。
- (2) 冲击载荷条件下,BSA 吸附膜厚要远远高于静止情况下的吸附膜厚;随着冲击次数增加,接触区内吸附膜不断增长,金属钢球表面吸附膜厚度会逐渐稳定,但陶瓷球接触产生的吸附膜厚低,且一直存在波动。
- (3) 蛋白质膜的吸附生长对冲击载荷的大小十分敏感,而对浓度不敏感。

参考文献:

- [1] 邱裕生, 靳忠民. 摩擦学原理与人工关节的设计和应[J]. 中华关节外科杂志: 电子版, 2012, 6(4): 63-64.
- [2] PHILPOTT A, WESTON-SIMONS JS, GRAMMATOPOULOS G, et al. Predictive outcomes of revision total hip replacement: A consecutive series of 1176 patients with a minimum 10-year follow-up [J]. Maturitas, 2014, 77(2): 185-190.
- [3] LIU F, JIN Z, ROBERTS P, et al. Importance of head diameter, clearance, and cup wall thickness in elastohydrodynamic lubrication analysis of metal-on-metal hip resurfacing prostheses [J]. J Eng Med, 2006, 220(6): 695-704.

- [4] GE S, KANG X, ZHAOY. One-year biodegradation study of UHMWPE as artificial joint materials: Variation of chemical structure and effect on friction and wear behavior [J]. *Wear*, 2011, 271(9): 2354-2363.
- [5] GHOSH S, CHOUDHURY D, DAS NS, *et al.* Tribological role of synovial fluid compositions on artificial joints: A systematic review of the last 10 years [J]. *Lubr Sci*, 2014, 26(6): 387-410.
- [6] MATTEI L, DI PUCCIO F, PICCIGALLO B, *et al.* Lubrication and wear modelling of artificial hip joints: A review [J]. *Tribol Int*, 2011, 44(5): 532-549.
- [7] 华子恺. 多功能摩擦学实验装置研制及人工髋关节综合性能研究[D]. 上海: 上海大学硕士学位论文, 2008.
- [8] SERRO AP, GISPERT MP, MARTINS MCL, *et al.* Adsorption of albumin on prosthetic materials: Implication for tribological behavior [J]. *J Biomed Mater Res*, 2006, 78(3): 581-589.
- [9] YAN Y, NEVILLE A, DOWSON D. Biotribocorrosion of CoCrMo orthopaedic implant materials: Assessing the formation and effect of the biofilm [J]. *Tribol Int*, 2007, 40(10): 1492-1499.
- [10] MAVRAKI A, CANN PM. Lubricating film thickness measurements with bovine serum [J]. *Tribol Int*, 2011, 44(5): 550-556.
- [11] FAN J, MYANT CW, UNDERWOOD R, *et al.* Inlet protein aggregation: A new mechanism for lubricating film formation with model synovial fluids [J]. *J Eng Med*, 2011, 225(7): 696-709.
- [12] NEČAS D, VRBKA M, URBAN F, *et al.* The effect of lubricant constituents on lubrication mechanisms in hip joint replacements [J]. *J Mech Behav Biomed*, 2016, 55: 295-307.
- [13] VRBKA M, KŘUPKA I, HARTL M, *et al.* *In situ* measurements of thin films in bovine serum lubricated contacts using optical interferometry [J]. *J Eng Med*, 2014, 228(2): 149-158.
- [14] 刘述芝, 胡志刚, 张健. 冲击载荷作用下运动员下肢动态响应的逆向动力学仿真[J]. *医用生物力学*, 2015, 31(1): 30-37.
- LIU SZ, HU ZG, ZHANG J. Inverse dynamics simulation on lower limb responses of badminton athlete under impact loads [J]. *J Med Biomech*, 2015, 31(1): 30-37.
- [15] 刘海超, 郭峰, 赵国全. 润滑膜厚测量的双色光干涉强度调制方法[J], *摩擦学学报*, 2015, 35(3): 282-287.
- [16] SEIREG A, ARVIKAR RJ. The prediction of muscular load sharing and joint forces in the lower extremities during walking [J]. *J Biomech*, 1975, 8(2): 89-102.
- [17] UNSWORTH A. Recent developments in the tribology of artificial joints [J]. *Tribol Int*, 1995, 28(7): 485-495.
- [18] WRIGHT AK, THOMPSON MR. Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence [J]. *Bio J*, 1975, 15(2 Pt 1): 137-141.
- [19] 栗心明. 高压弹流油膜界面滑移特性研究[D]. 青岛: 青岛理工大学博士学位论文, 2012.
- [20] 王成焘. 天然与人工关节中的摩擦学问题[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(5): 317-325.
- WANG CT. Tribology problems in natural and artificial joint [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(5): 317-325.
- [21] GE S, KOJIO K, TAKAHARA A, *et al.* Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: Influence of the phase separation on protein adsorption patterns [J]. *J Biomater Sci*, 1998, 9(2): 131-150.
- [22] NAKANISHI K, SAKIYAMA T, IMAMURA K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91(3): 233-244.
- [23] THEMISTOU E, SINGH I, SHANG C, *et al.* Application of fluorescence spectroscopy to quantify shear-induced protein conformation change [J]. *Biophys J*, 2009, 97(9): 2567-2576.
- [24] ORTEGA-VINUESA JL, TENGVALL P, WÄLIVAARA B, *et al.* Stagnant versus dynamic conditions: A comparative adsorption study of blood proteins [J]. *Biomaterials*, 1998, 19(1): 251-262.