



Research
Precision Engineering—Article

面向生物医学临床应用的激光微加工功能表面

胡国庆^{a,b,#}, 管凯^{c,#}, 卢立斌^a, 张佳茹^a, 聂璐^d, 管迎春^{a,b,e,*}

^a School of Mechanical Engineering and Automation, Beihang University, Beijing 100083, China

^b Hefei Innovation Research Institute, Beihang University, Hefei 230013, China

^c Department of Oncology, Center of Excellence, BOE Hefei Digital Hospital Co., Ltd., Hefei 230013, China

^d Beijing Long March Space Vehicle Research Institute, First Academy of the China Aerospace Corporation, Beijing 100076, China

^e National Engineering Laboratory of Additive Manufacturing for Large Metallic Components, Beihang University, Beijing 100083, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2018

Revised 12 June 2018

Accepted 18 September 2018

Available online 25 September 2018

关键词

激光微加工

功能表面

金属合金

生物相容性

表面增强拉曼散射

摘要

金属医用材料以其高强度、强抗断性、优良的导电性和良好的生物相容性等特点，在医疗器械中日益得到广泛应用。但金属医用材料表面生物性能的不足在很大程度上限制了其进一步的应用。激光微加工是一种增强材料表面性能的先进技术，本文系统验证、展示激光微加工医用金属生物材料镁合金和钛合金的可行性，阐述其在细胞黏附和液体活检的应用前景。本文研究激光与材料的相互作用、材料微结构演化和表面性能，分析相关细胞行为和表面增强拉曼散射效应。实验结果表明，细胞在激光微加工表面黏附性能好，并可沿预先设计结构方向生长。此外，激光功能表面可显著增强拉曼信号，增强因子可达 6×10^3 以上。

© 2018 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

由于具有强度高、抗断裂和生物相容性好等优点，金属医用材料广泛应用于体内体外医疗器械领域[1]。医用材料表面改性是控制细胞黏附、迁移、定向、形状甚至基因表达等的有效方法[2–6]。例如，细胞和植入物之间的良好黏附对于骨折修复至关重要，因为它不仅影响骨组织的生长和代谢，而且对骨组织的修复和重建也有影响[7–9]。与传统的表面改性技术（如光刻、静电纺丝、电子束光刻和化学图案化）相比[10–12]，激光加工的优点主要包括无污染、增强因子高、成本低、

表面性能均匀一致和可重复性强以及具有修饰微米甚至纳米级表面形貌的能力。因此，近年来，激光微加工引起了科学家和工程师的广泛关注。Martínez-Calderon等[13]研究了在不锈钢表面激光诱导周期性表面结构的细胞培养能力，发现细胞在激光诱导周期性表面结构上沿特定方向优先排列和黏附。Cunha等[14]报道通过超快激光表面织构技术制备的激光诱导周期性表面结构可用于诱导整形外科植入物的人类间充质干细胞(hMSCs)拉伸。Dumas等[15]在钛(Ti)合金表面制作三种仿生图案，试验结果表明激光诱导周期性表面结构和微坑组合可以增强成骨能力。镁(Mg)合金是一种极具前景

* Corresponding author.

E-mail address: guanyingchun@buaa.edu.cn (Y. Guan).

These authors contributed equally to this work.

的生物材料，由于其可降解且具有与人体骨骼相似的弹性模量，镁合金植入物研究获得了广泛关注[16–18]。然而，在镁合金表面快速降解时，高的离子释放速率和局部pH的巨大变化严重恶化细胞的生存环境，并显著降低细胞活性[12]。为此，提出了通过激光表面改性提高商用镁合金耐腐蚀性的解决方案，并在随后几十年进行了广泛研究[19,20]。但激光处理镁合金表面后的细胞行为还鲜有公开报道。

由于具有无创性、便于取样以及在细胞和DNA检测中具有实时监测的能力，液体活检在癌症的诊断和治疗中起着越来越重要的作用[21–24]。选择具有优异特异性、灵敏度和稳定性的检测指标对于提高脂质活组织检查的准确性和效率是非常必要的。表面增强拉曼散射(SERS)已被广泛用于生物材料分析和基于光子非弹性散射导致分子振动光谱信息的低浓度生化分子检测。近年来，检测基底的表面周期性结构已经成功地用于增强拉曼散射，从而达到提高检测灵敏性和高效修复的目的。目前已报道的各种激光诱导SERS技术大致可分为两类：硅(Si)基和非Si基。对于Si基底，Xu等[25]发现Si表面粒径小于100 nm时的微米和纳米结构可最大限度增强拉曼散射。Zhu等[26]报道具有三维微米或纳米结构的激光烧蚀镀金(Au) Si晶片对于罗丹明6G(R6G)分子具有高达 3×10^7 的SERS增强效果，其原因是材料表面积增加以及不同尺寸Au纳米颗粒的存在。Parmar等[27]在黑色Si基底上构建金属纳米颗粒修饰的纳米支架结构，表明激光纹理表面的表面等离子体效应和“热点”可显著增强拉曼信号。对于非Si基底，Buividas等[28]通过激光直写方法在蓝宝石表面产生纳米纹理表面；其SERS信号及信号均匀性分别是商用SERS传感基板的15倍和2倍。Rebollar等[29]利用纳秒激光在旋涂聚合物薄膜上制备了镀金的激光诱导周期性表面结构，并研究了它们作为SERS基底的性能。镀金基底的增强因子提高了约8个数量级，而激光诱导周期性表面结构使增强因子额外增加约10倍。但目前还少有关于其生物相容性的公开报道。

本文研究激光微加工技术制备生物医用镁合金和钛合金功能表面，探索增强表面生物相容性的可行性。首先对镁-钆-镓(Mg-Gd-Ga)合金进行激光表面改性。随后，基于细胞培养方法，对初始样品和激光改性样品表面细胞活力和黏附性进行系统评估。此外，本文还利用飞秒激光在钛合金表面制备三维周期性微纳结构，用来增强样品拉曼光谱检测信号，并实现了检测效率和灵

敏度同时提高。

2. 用于提高生物相容性的 Mg 合金激光熔融和激光诱导周期性结构

作为商用镁合金潜在替代品，Mg-Gd基合金具有良好的生物相容性和力学性能。与某些其他稀土元素一样，Gd具有良好的生物相容性。此外，在共晶温度下Gd在Mg中溶解度较大且可形成金属间相，将Gd引入合金中有益于增强固溶体的形成和沉淀。

2.1. 实验步骤

2.1.1. 实验材料

作为Mg基质和Mg-6Gd基合金的Mg-Gd共晶相中的固溶体元素，钙(Ca)有助于细化晶粒并提高合金的屈服强度。因此，实验材料选择热挤压的Mg-6Gd-0.6Ca合金棒。棒直径为9 mm，使用碳化硅(SiC)刀片切割成4 mm的薄片。用乙醇清洗后，将合金在0.5%苦味酸(1 g苦味酸、24 mL蒸馏水、24 mL乙酸和200 mL乙醇)的溶液中蚀刻。

2.1.2. 激光加工

在氩气(Ar)气氛环境中，利用中心波长为1064 nm和光斑尺寸为100 μm 的连续波(CW)光纤激光器对Mg-6Gd-0.6Ca合金进行表面改性。扫描速度和功率密度分别设定为 $70 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $2.04 \times 10^6 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

在环境温度和压力下，且不需要保护气氛，使用Ti:蓝宝石啁啾脉冲再生放大激光系统(中心波长为1064 nm，脉冲宽度为800 fs，重复频率为400 kHz)在激光熔融表面上进行表面织构化实验。高斯光束的光斑直径约为35 μm ，通过调整激光参数获得激光诱导周期性表面结构。

2.1.3. 表面表征

通过光镜(LV150N, Nikon Corporation Japan)和配置能谱仪(EDS)的扫描电子显微镜(SEM)(SU8010, Hitachi Ltd. Japan)测量和表征表面形貌。使用X射线衍射仪(D/max2200PC, Rigaku Corporation Japan)进行物相测量。

2.1.4. 生物腐蚀试验

通过氢气释放体积监测Mg合金的降解速率。研究

并测量了原样品、激光熔融处理样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的氢气释放量,采用溶剂为Hanks平衡盐溶液(HBSS),使用了循环水浴,实验时间为34 h,测试温度为37 ℃。样品单位面积对应的HBSS体积为20 mL·cm⁻²。图1为测试装置,该装置细节详见文献[30]。每隔2 h测量一次析氢量。

使用电化学工作站(CHI660e, CH Instruments Inc., USA)测量37 ℃下,样品在HBSS中的电化学特性。表1所述为HBSS溶液的化学组成。在采用的三电极系统中,饱和甘汞电极作为参比电极,碳电极作为对电极;待测样品作为工作电极,其溶液中的接触面积为0.64 cm²。测量原样品和激光改性样品塔菲尔曲线时的扫描速度为1 mV·s⁻¹。

2.1.5. 细胞培养

应用小鼠颅骨前成骨细胞(MC3T3-E1, 北京协和医学院, 中国)检测镁合金的体外生物相容性。MC3T3-E1在具有10%胎牛血清(FBS)、改良Eagle培养基(DM电磁场)、37 ℃的100 μg·mL⁻¹链霉素和

100 U·mL⁻¹青霉素的混合物中进行培养,培养气氛为含5%二氧化碳(CO₂)的湿润气氛。

2.1.6. 细胞活性和细胞形态

首先将样品置于紫外线辐射下2 h进行灭菌。在表面加入70 mL MC3T3-E1细胞悬浮液进行细胞接种,然后培养48 h。每个样品的初始密度为7×10⁴,并接种于24孔板中。对细胞形态进行测量时,将细胞接种的支架用磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗三次并在多聚甲醛中放置30 min,同时使用PBS将样品洗涤三次,然后使用分级乙醇脱水。经真空干燥和喷金颗粒后,使用SEM进行样品表征。将样品浸泡在70%乙醇溶液中进行细胞固定,并使用5 mg·L⁻¹吖啶橙染料对细胞进行染色,然后进行荧光显微检测。采用配备电荷耦合器件(CCD)相机(iXON电磁场+DU-897E-CSO-UVB, Andor Technology Ltd., Ireland)的荧光显微镜(IX71, Olympus Corporation Germany)进行测试,得到荧光检测结果。

2.2. 结果和讨论

2.2.1. 组织结构

如图2(a)所示,原镁合金样品由α-Mg基体和β相Mg₅Gd组成[31,32]。激光改性后,X射线衍射(XRD)结果显示激光熔融表面仅含有α-Mg相;在基体及熔融层未发现Mg-Ca共晶相。这是由于Mg-6Gd-0.6Ca合金中存在少量Ca[33]。图2(b)展示了激光改性后Mg-6Gd-0.6Ca的典型凝固组织和表面形态,激光处理后产生了400 μm厚的具有凝固微观结构的熔融层,该熔融层主要由细小的α-Mg相柱状晶粒组成[34]。在激光表面处理过程中,激光辐照使基体温度急剧增加,瞬间达到熔点。当激光束移开时,温度瞬间下降,熔化层形成巨大的温度梯度并快速冷却。因此,在激光熔融层中未发现β相。在激光熔融表面上产生的激光诱导周期性表面结构的表面面貌如图3(a)所示。根据图3(b)所示的表面轮廓,激光诱导周期性表面结构的深度和周期分别为约250 nm和900 nm。

2.2.2. 氢气释放

图4显示了原样品、激光熔融样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构样品浸入HBSS中的析氢数据。Mg腐蚀反应方程式如下所示[35]:



如反应式(1)所示,Mg与水(H₂O)反应形成氢

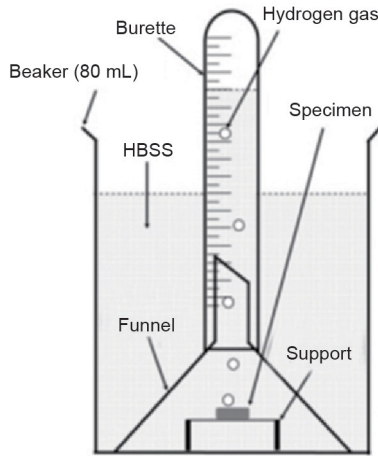


图1. 浸入实验中的氢气析出测量装置。

表1 HBSS化学组成

Composition	Concentration (mmol·L ⁻¹)
Na ⁺	142.0
K ⁺	5.8
Mg ²⁺	0.8
Ca ²⁺	2.5
Cl ⁻	145.0
HCO ₃ ⁻	4.2
H ₂ PO ₄ ⁻	0.4
HPO ₄ ²⁻	0.3
SO ₄ ²⁻	0.8

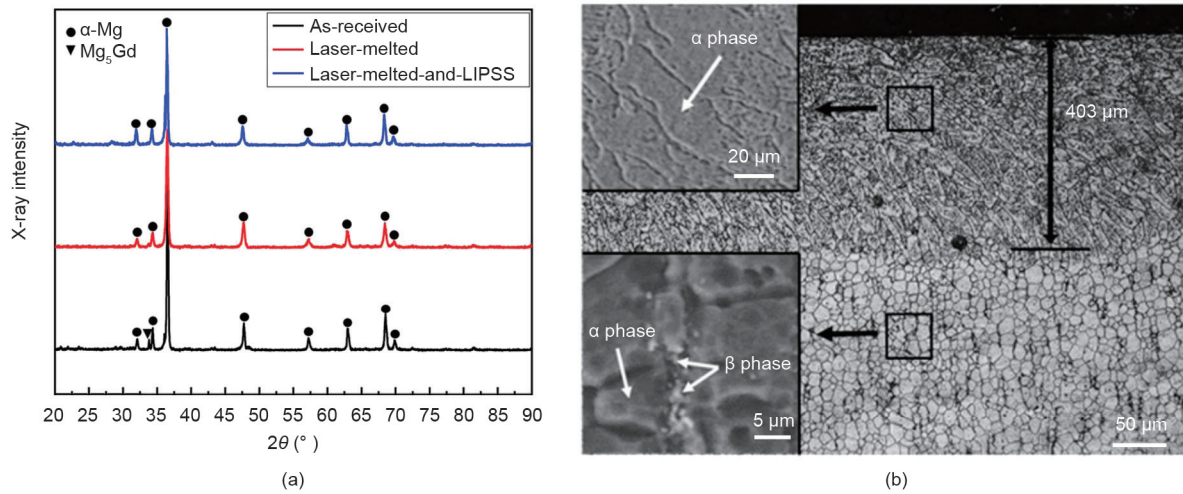


图2. Mg合金激光处理前后的显微结构和相组成。(a) XRD测试结果；(b) 激光熔融镁合金的截面形貌。

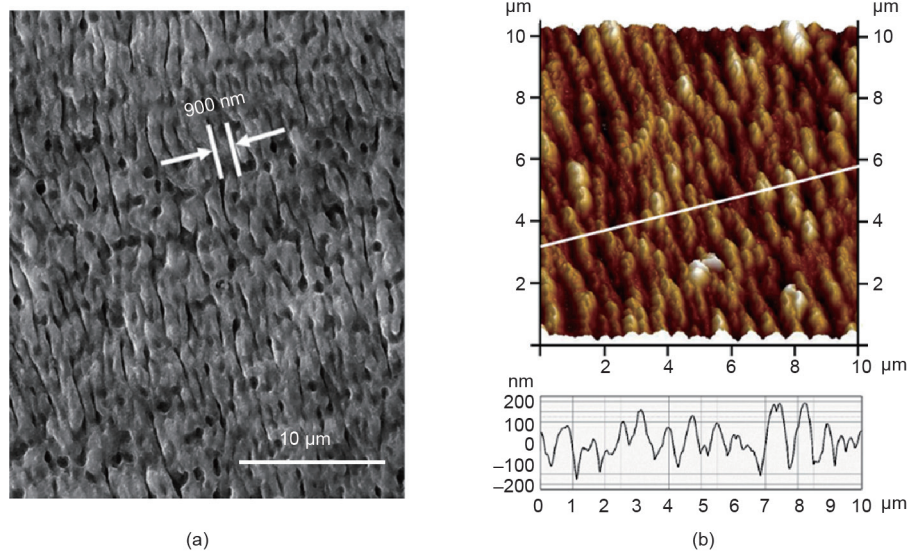


图3. 激光熔融Mg合金表面激光诱导周期性表面结构的 (a) 扫描电子显微镜和 (b) 原子力显微镜照片。

气 (H_2)。 H_2 的析出量不受Mg表面形成的腐蚀产物的影响。通过测量在一段时间内释放的总 H_2 来估算 H_2 释放速率 (V_H , $mL \cdot cm^{-2} \cdot d^{-1}$) [36]。表2给出了 H_2 总释放量和与平均腐蚀速率相对应的 H_2 释放速率。

如图4所示，浸泡48 h后，原样品、激光熔融样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构样品产生的氢气体积分别为205 mL、7.8 mL和16.6 mL。该结果表明，激光熔融和激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理试样均可有效提高Mg-6Gd-0.6Ca合金的耐腐蚀性，并显著降低在HBSS溶液中的降解速率。从 H_2 释放速率估算，激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的腐蚀速率略高于激光熔融处理样品的腐蚀速率，比原样品腐蚀速率降低约12倍。这可能是由于原样中的 β - Mg_5Gd

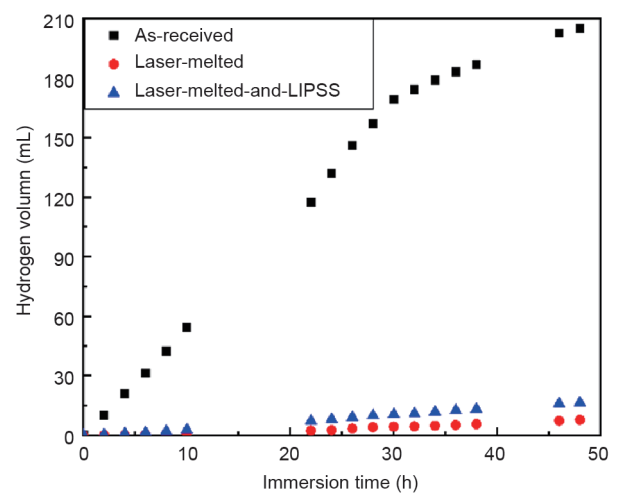


图4. 在HBSS中浸泡48 h内，原样品、激光熔融样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构样品产生的氢气体积。

表2 H₂释放总量以及H₂释放速率

Specimens	Total H ₂ release (mL)	H ₂ evolution rate (mL·cm ⁻² ·d ⁻¹)
As-received	205.0	25.625
Laser-melted	7.8	0.975
Laser-melted-and-LIPSS	16.6	2.075

相充当电偶阴极，从而加速基体腐蚀[34]。在激光表面改性之后，β相溶解到基体中显著降低了电偶腐蚀。此外，在熔融样品表面上诱导的激光诱导周期性表面结构增加了表面积并降低了熔融层厚度，从而导致腐蚀速率相对增加。如表2所示，浸泡48 h后，原样品、激光熔融处理样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的H₂释放速率分别为25.625 mL·cm⁻²·d⁻¹、0.975 mL·cm⁻²·d⁻¹和2.075 mL·cm⁻²·d⁻¹。已知人体耐受的H₂吸收速率为2.25 mL·cm⁻²·d⁻¹。因此，激光熔融处理样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的H₂释放速率均低于人体的耐受值。

2.2.3. 电化学测量

如图5所示，在HBSS中进行了原始样品、激光熔融处理样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的极化研究。表3总结了它们的腐蚀电压 (E_{corr}) 和腐蚀电流密度 (i_{corr})。与原样品的 E_{corr} 值 (-1.508 V) 相比，激光熔融处理样品具有更大的腐蚀电压 (-1.406 V)。在熔融表面上产生激光诱导周期性表面结构之后，其 E_{corr} 略微变小 (-1.421 V)，但仍大于原样品 E_{corr} 。该结果表明，激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品与熔融样品相比更显阴性，但与原始样品相比则更不偏阴性，主要是在熔融表面上诱导的激光诱导周期性表面结构可能破坏了表面并减小熔融层的厚度。这一结果与图4所示的浸入实验结果非常吻合。此外，激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的 i_{corr} 结果远低于原样，但略高于激光熔融处理样品。这表明激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的腐蚀速率低于原样品，但高于激光熔融处理样品的腐蚀速率。

2.2.4. 体外生物相容性

如图6所示，在细胞接种后4 h，研究在原样品、激光熔融处理样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的表面上的细胞铺展行为，包括分布和形态。由于耐腐蚀性差，在原样品表面上未观察到细胞。如图6(a)所示，在培养过程中发生严重腐蚀后，在表面

表3 在HBSS中原样品、激光熔融处理样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理样品的 E_{corr} 和 i_{corr} 值

Specimens	E_{corr} (V)	i_{corr} (mA·cm ⁻²)
As-received	1.508	0.055 4
Laser-melted	1.406	0.001 58
Laser-melted-and-LIPSS	1.421	0.004 84

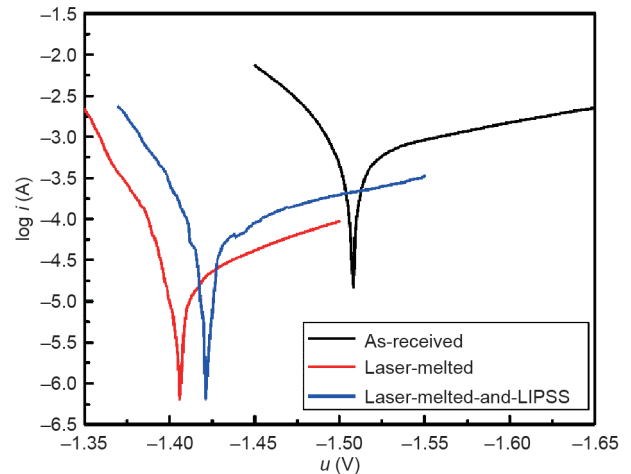


图5. 在HBSS中原样品、激光熔融样品和激光熔融-激光诱导周期性表面结构样品的电位动力学极化测试结果。

观察到棒状晶体的形成。MC3T3-E1细胞的活性受到腐蚀引起的pH值增加和Mg²⁺大量释放的抑制[38]。相反，在所有激光熔融样品表面上，细胞表现出良好的黏附性能并各向异性生长，如图6(b)和(c)所示。图6(c)表明细胞铺展在激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理表面上是各向异性的，且具有大量以丝状伪足形式存在的黏着斑。由于丝状伪足通常作为细胞探索外部环境的纳米传感器，故丝状伪足的形态可表明细胞迁移。图6(d)中黏着斑的高倍放大图片显示了细胞沿着激光诱导周期性表面结构的特定方向迁移，且在前面和后面区域存在树状结构。

细胞黏附的荧光研究表明，激光熔融-激光诱导周期性表面结构样品表面的细胞[图7(b)]呈现出拉长形态，且表面积相较激光熔融处理表面样品的更小[图7(a)]。这主要是由于激光诱导周期性表面结构引起的细胞骨架重组过程中细胞形状各向异性，激光诱导周期性表面结构可提供各向异性和持续的机械刺激[17]。由于耐腐蚀性和表面形貌的综合影响，激光熔融处理表面的细胞密度高于激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理表面。一方面，生物腐蚀试验表明，激光熔融处理表面的耐腐蚀性优于激光熔融-激光诱导周期性表面结构处理表面，导致环境的pH值和Mg²⁺浓度较低，这可能更

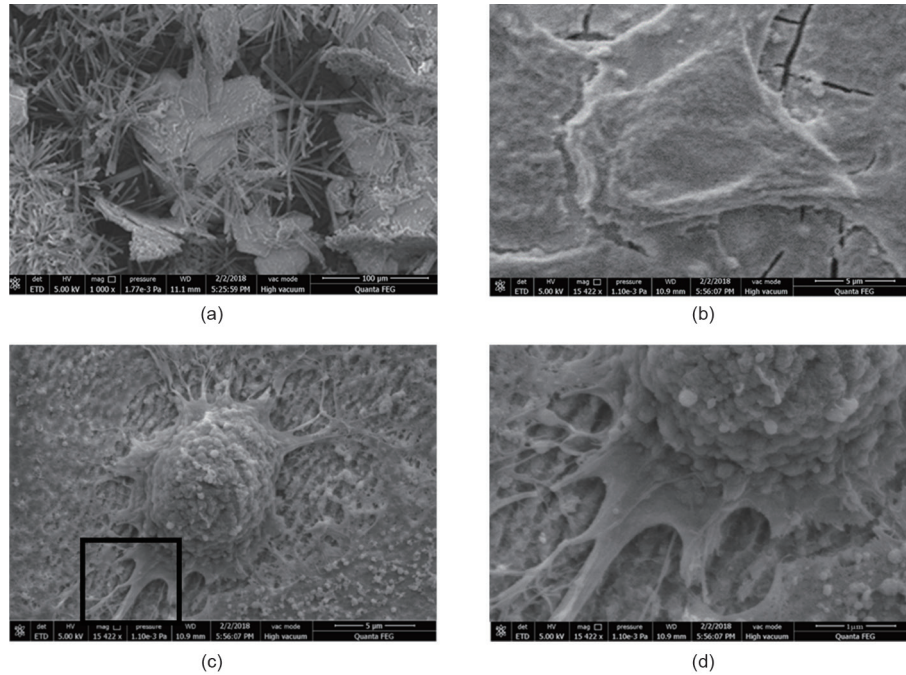


图6. 成骨细胞在 (a) 原样品、(b) 激光熔融样品和 (c) 激光熔融-激光诱导周期性表面结构样品表面培养48 h后的SEM图片和 (d) 放大的细胞突起。

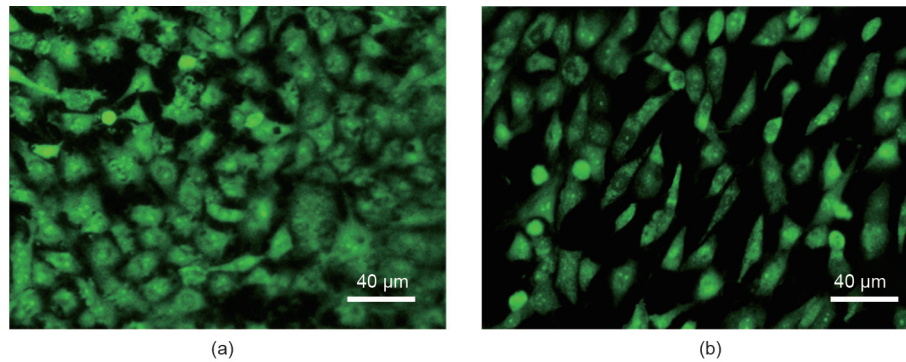


图7. (a) 激光熔融和 (b) 激光熔融-激光诱导周期性表面结构样品表面培养48 h后成骨细胞形态的荧光图像。

有利于细胞存活和黏附；另一方面，据报道，尺寸超过70 nm的表面结构可能影响整合素聚集效率，导致细胞黏附性降低[20]。在本实验中，周期为900 nm、深度为250 nm的激光诱导周期性表面结构可降低细胞黏附。

因此，本文提出了在熔融处理表面上制备激光诱导周期性表面结构能够促进成骨细胞的生长，并且由于良好的黏附性而加速骨化；这表明参与骨折愈合的细胞在骨折处发生聚集，并加速骨愈合。

3. 用于 SERS 的钛合金表面大规模激光诱导周期性结构

尽管以特定拉曼特征峰的形式进行灵敏检测的

SERS基板已经设计完成，但是如何设计一种简单制备方法来获得针对生物医学材料的具有SERS响应且具有生物相容性的基板仍是一项具有挑战性的任务。在本研究中，利用飞秒激光的激光辐照在生物钛合金表面上形成激光诱导周期性表面结构。本文的研究利用激光诱导周期性表面结构增强SERS光谱信号鲜有报道，有望应用在生物检测和生物成像领域。

3.1. 实验过程

3.1.1. 实验材料

将Ti6Al4V基材切割成尺寸为10 mm×10 mm×1 mm的样品。在激光加工之前，用不同粗糙度的SiC砂纸对样品进行抛光（从380到4000，以获得小于0.01 μm的表面粗糙度），随后在丙酮中进行超声清洗。

3.1.2. 激光加工

如图8所示，在空气、环境温度和压力等条件下，使用Ti:蓝宝石激光系统（中心波长为800 nm，脉冲宽度为35 fs，重复频率为400 kHz）以正入射方式制备激光诱导周期性表面结构。测得高斯光束光斑直径为35 μm 。使用电子束蒸发器在激光加工Ti6Al4V表面上沉积金（99.99%纯金）薄膜，并将其用于SERS检测。

3.1.3. 结构表征

利用SEM（SU8010, Hitachi Ltd. Japan）和原子力显微镜（AFM; ICON, Bruker Corporation, USA）表征表面形貌。应用Nanoscope Analysis 1.4软件对选定10 μm \times 10 μm 区域进行三维AFM扫描区域观测和分析。

3.1.4. SERS 测量

使用结晶紫（CV, 98%纯度, Sigma-Aldrich）作为探针分子。将体积约为5 μL 的溶液滴到基材上，然后在空气中干燥。干燥基底被用于进行SERS信号测量和拉曼光谱分析。用于记录拉曼光谱的拉曼显微镜系统（HORIBA Jobin Yvon, France）的激光二极管具有532 nm激发源，并且光功率约为5 mW时，CCD工作。采集时间为10 s，累积次数为10次。20倍显微物镜（数值孔径=0.45）和配备600 $\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ 衍射光栅的热电冷却CCD阵列被用来检测信号。

3.2. 结果和讨论

3.2.1. 形貌结构

当入射激光能量密度接近钛的烧蚀阈值[39]时，在Ti6Al4V表面上制备得到具有三维Au涂层的激光诱导周期性表面结构。图9（a）和（b）分别是三维激光诱导周期性表面结构的45°视图和凹槽的放大视图。从图中

可以明显观察到周期为600 nm的周期结构以及随机分布其上的直径在60~200 nm之间的纳米颗粒。另外，如图9（c）所示，使用光镜对更大尺度上的三维激光诱导周期性表面结构进行测量，测得其平均周期为30 μm ，深度为14 μm 。此外，进一步测量了如图9（d）所示的三维激光诱导周期性表面结构的横截面轮廓，以验证上述结果。

3.2.2. 拉曼增强

图10显示了 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀释CV在不同干燥的基板上的拉曼光谱。CV光谱包括相应分子振动的特征谱带[40,41]。对于无涂层的原样品表面没有观察到拉曼信号。镀金的原样品具有913 cm^{-1} 、1617 cm^{-1} 和1646 cm^{-1} 处谱带的拉曼信号。该结果表明金纳米粒子可增强SERS，这与先前的报道一致[42]。对于三维激光诱导周期性表面结构基板，观察到 10^3 倍的强度增强，表明三维激光诱导周期性表面结构对于SERS基底制备影响显著。对于镀金的三维激光诱导周期性表面结构样品，金膜沉积后基板的灵敏度和强度得到进一步提高，这主要归因于金在可见光范围内可产生等离子体激元[43]。表4列出了三维激光诱导周期性表面结构和镀金的三维激光诱导周期性表面结构样品在913 cm^{-1} 、1176 cm^{-1} 、1374 cm^{-1} 和1618 cm^{-1} 处谱带的相应拉曼信号增强因子。增强因子取五个不同位置的平均值。结果表明，镀金三维激光诱导周期性表面结构样品在1374 cm^{-1} 拉曼峰处的增强因子最高达到了 6.7×10^3 。

局部表面等离子共振（LSPR）和表面等离子体激元（SPP）将引起局部电磁（电磁场）的显著增强，这对SERS来说十分重要[44,45]。如图11所示，当金属纳米粒子的尺寸小于入射光的波长时，LSPR发生，导致金属纳米粒子中的价电子的集体振荡[46,47]。LSPR会

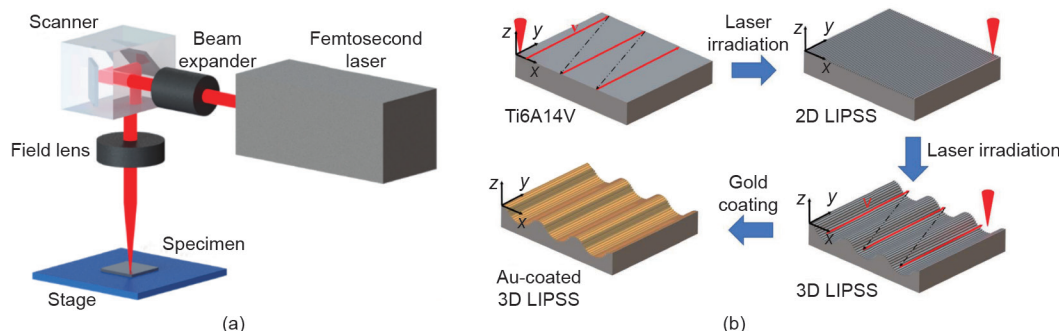


图8. (a) 实验装置；(b) 镀Au三维激光诱导周期性表面结构的制作流程。

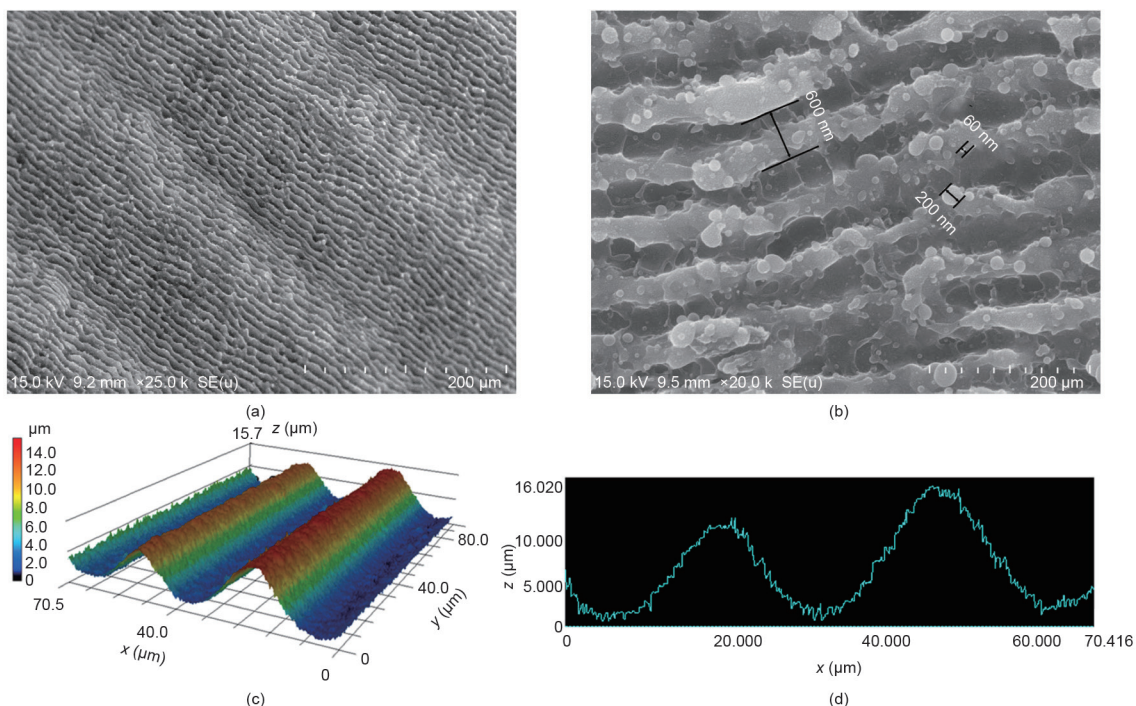


图9. 在Ti6Al4V表面上制备的三维激光诱导周期性表面结构的表面形貌。(a) SEM图像；(b) 三维激光诱导周期性表面结构放大图；(c) 三维激光诱导周期性表面结构的三维光学图像；(d) 三维激光诱导周期性表面结构的截面剖面图。

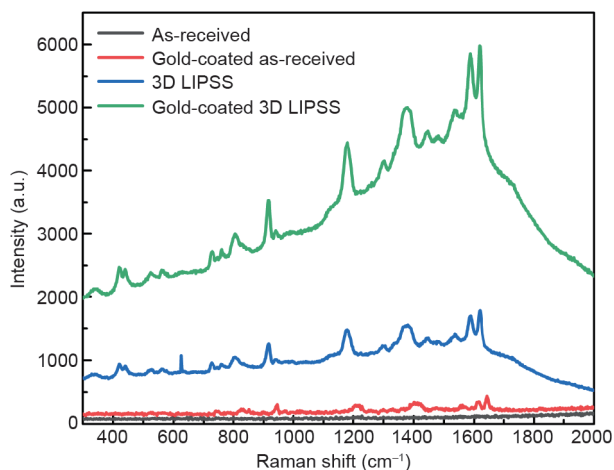


图10. $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CV分子吸附在原始表面、镀Au原始表面、三维激光诱导周期性表面结构和镀Au三维激光诱导周期性表面结构表面的SERS光谱。

将纳米粒子周围的入射电磁场集中。SPP是由纳米结构周期性激发产生的传导电荷振荡。SPP将沿周期性纳米结构扩散并产生强烈的电磁场限制[48]。然而，在SPP沿表面传播的过程中，由于金属吸收而失去能量，导致电磁场衰减[49]。因此，拉曼信号的增强是由三维激光诱导周期性表面结构上产生的直径范围为60~200 nm的纳米颗粒激发LSPR，以及由周期性激光诱导周期性表面结构激发SPP所引起的。

表4 三维激光诱导周期性表面结构SERS基底的增强因子

Raman bands (cm^{-1})	Au-coated 3D LIPSS	3D LIPSS
913	2132	538
1176	2111	319
1374	6732	1074
1618	1123	279

4. 结论

(1) 系统研究并对比激光表面改性前后Mg-6Gd-0.6Ca合金的组织结构变化、腐蚀行为和生物相容性。结果发现，激光改性表面厚度可达403 μm ，显微组织只有 α -Mg相，并未发现初始组织的 β 相，有利于显著减少电偶腐蚀。体外细胞培养结果显示MC3T3-E1细胞在所有激光改性样品表面均表现出良好黏附性能；此外，细胞在激光诱导周期性表面结构处理表面表现出显著拉伸趋势，并在外缘生长出长丝状伪足。

(2) 飞秒激光在Ti6Al4V合金基底一站式制备三维周期性微纳结构。由于表面积增加和纳米颗粒的存在，该三维周期微纳结构能够大幅度增强拉曼光谱检测信号，增强因子可达 6×10^3 。三维激光诱导周期性表面结构的LSPR效应和纳米粒子“热点”效应是导致拉曼增强效果的主要原因。

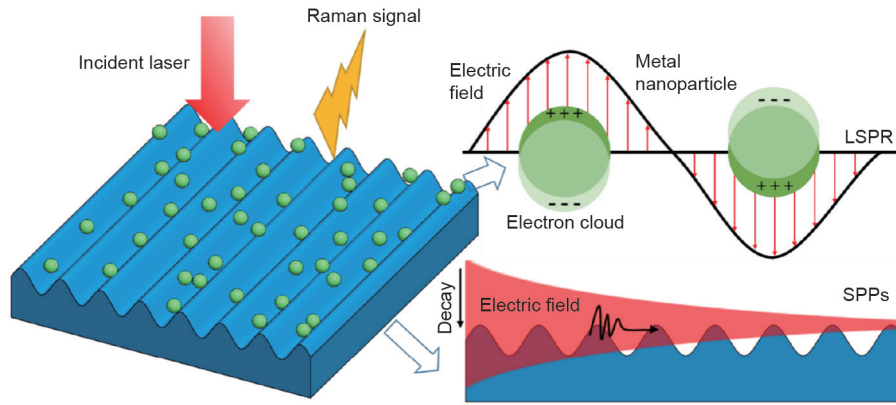


图11. 拉曼测量中激光辐照引起SPP和LSPR的原理图。

致谢

本研究得到了国家重点研发计划(2018YFB1107400)、国家重点基础研究发展计划(2015CB059900)、国家自然科学基金(51705013)和北京自然科学基金(3162019和J170002)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Guoqing Hu, Kai Guan, Libin Lu, Jiaru Zhang, Nie Lu, and Yingchun Guan declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- Pan F, Gao S, Chen C, Song C, Zeng F. Recent progress in resistive random access memories: materials, switching mechanisms, and performance. *Mater Sci Eng Rep* 2014;83:1–59.
- Xiong Y, Li H, Wang P, Liu P, Yan Y. Improved cell adhesion of poly(amino acid) surface by cyclic phosphonate modification for bone tissue engineering. *J Appl Polym Sci* 2018;135(21):46226.
- Escobar Ivirico JL, Bhattacharjee M, Kuyinu E, Nair LS, Laurencin CT. Regenerative engineering for knee osteoarthritis treatment: biomaterials and cell-based technologies. *Engineering* 2017;3(1):16–27.
- Guan Y, Zhou W, Zheng H. Effect of laser surface melting on corrosion behaviour of AZ91D Mg alloy in simulated-modified body fluid. *J Appl Electrochem* 2009;39(9):1457–64.
- Korhonen E, Riikonen J, Xu W, Lehto V, Kauppinen A. Cytotoxicity of mesoporous silicon microparticles with different surface modifications on ARPE-19 cells. *Acta Ophthalmol* 2014;92(S253):3257.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005;26(18):3995–4021.
- Lo Celso C. Revealing the inner workings of human HSC adhesion. *Blood* 2017;129(8):921–2.
- Diener A, Nebe B, Lüthen F, Becker P, Beck U, Neumann HG, et al. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials* 2005;26(4):383–92.
- Won JE, Yun YR, Jang JH, Yang SH, Kim JH, Chrzanowski W, et al. Multifunctional and stable bone mimic proteinaceous matrix for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2015;56:46–57.
- Lee JY, Shah SS, Zimmer CC, Liu GY, Revzin A. Use of photolithography to encode cell adhesive domains into protein microarrays. *Langmuir* 2008;24(5):2232–9.
- Javaherian S, O'Donnell KA, McGuigan AP. A fast and accessible methodology for micro-patterning cells on standard culture substrates using Parafilm™ inserts. *PLoS One* 2011;6(6):e20909.
- Ross AM, Jiang Z, Bastmeyer M, Lahann J. Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity. *Small* 2012;8(3):336–55.
- Martínez-Calderon M, Manso-Silván M, Rodríguez A, Gómez-Aranzadi M, García-Ruiz JP, Olaizola SM, et al. Surface micro- and nano-texturing of stainless steel by femtosecond laser for the control of cell migration. *Sci Rep* 2016;6:36296.
- Cunha A, Zouani OF, Plawinski L, Botelho do Rego AM, Almeida A, Vilar R, et al. Human mesenchymal stem cell behavior on femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V surfaces. *Nanomedicine* 2015;10(5):725–39.
- Dumas V, Guignandon A, Vico L, Mauclair C, Zapata X, Linossier MT, et al. Femtosecond laser nano/micro patterning of titanium influences mesenchymal stem cell adhesion and commitment. *Biomed Mater* 2015;10(5):055002.
- Manakari V, Parande G, Gupta M. Selective laser melting of magnesium and magnesium alloy powders: a review. *Metals (Basel)* 2017;7(1):2.
- Willbold E, Weizbauer A, Loos A, Seitz JM, Angrisani N, Windhagen H, et al. Magnesium alloys: a stony pathway from intensive research to clinical reality. Different test methods and approval-related considerations. *J Biomed Mater Res A* 2017;105(1):329–47.
- Guan YC, Zhou W, Li ZL, Zheng HY. Laser-induced microstructural development and phase evolution in magnesium alloy. *J Alloys Compd* 2014;582:491–5.
- Guan YC, Zhou W, Li ZL, Zheng HY. Influence of overlapping tracks on microstructure evolution and corrosion behavior in laser-melt magnesium alloy. *Mater Design* 2013;52:452–8.
- Coy AE, Viejo F, García-García FJ, Liu Z, Skeldon P, Thompson GE. Effect of excimer laser surface melting on the microstructure and corrosion performance of the die cast AZ91D magnesium alloy. *Corros Sci* 2010;52(2):387–97.
- Voelker R. Liquid biopsy receives approval. *JAMA* 2016;316(3):260.
- De Lázaro I, Kostarelos K. Optical diagnostics: nanosensors for liquid biopsies. *Nat Biomed Eng* 2017;1:0063.
- Diaz Jr LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32(6):579–86.
- Schrump DS. Circulating tumor DNA: solid data from liquid biopsies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2017;154(3):1132–3.
- Xu K, Zhang C, Zhou R, Ji R, Hong M. Hybrid micro/nano-structure formation by angular laser texturing of Si surface for surface enhanced Raman scattering. *Opt Express* 2016;24(10):10352–8.
- Zhu Z, Yan Z, Zhan P, Wang Z. Large-area surface-enhanced Raman scattering-active substrates fabricated by femtosecond laser ablation. *Sci China Phys Mech Astron* 2013;56(9):1806–9.
- Parmar V, Kanaujia PK, Bommali RK, Vijaya Prakash G. Efficient surface enhanced Raman scattering substrates from femtosecond laser based fabrication. *Opt Mater* 2017;72:86–90.
- Buividas R, Stoddart PR, Juodkazis S. Laser fabricated ripple substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Ann Phys* 2012;524(11):L5–L10.
- Rebollar E, Sanz M, Pérez S, Hernández M, Martín-Fabiani I, Rueda DR, et al. Gold coatings on polymer laser induced periodic surface structures: assessment as substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Phys Chem Chem Phys* 2012;14(45):15699–705.
- Jang Y, Tan Z, Jurey C, Collins B, Badve A, Dong Z, et al. Systematic understanding of corrosion behavior of plasma electrolytic oxidation treated AZ31 magnesium alloy using a mouse model of subcutaneous implant. *Mater Sci Eng C* 2014;45:45–55.
- Ma C, Peng G, Nie L, Liu H, Guan Y. Laser surface modification of Mg–Gd–Ca alloy for corrosion resistance and biocompatibility enhancement. *Appl Surf Sci* 2018;445:211–6.
- Xiao B, Yang Q, Yang J, Wang W, Xie G, Ma Z. Enhanced mechanical properties

- of Mg-Gd-Y-Zr casting via friction stir processing. *J Alloys Compd* 2011;509(6):2879–84.
- [33] Zhang X, Dai J, Yang H, Liu S, He X, Wang Z. Influence of Gd and Ca on microstructure, mechanical and corrosion properties of Mg-Gd-Zn(-Ca) alloys. *Mater Technol* 2017;32(7):399–408.
- [34] Liu Y, Kang Z, Zhou L, Zhang J, Li Y. Mechanical properties and biocorrosion behaviour of deformed Mg-Gd-Nd-Zn-Zr alloy by equal channel angular pressing. *Corros Eng Sci Technol* 2016;51(4):256–62.
- [35] Xin Y, Huo K, Tao H, Tang G, Chu P. Influence of aggressive ions on the degradation behavior of biomedical magnesium alloy in physiological environment. *Acta Biomater* 2008;4(6):2008–15.
- [36] Taltavull C, Shi Z, Torres B, Rams J, Atrens A. Influence of the chloride ion concentration on the corrosion of high-purity Mg, ZE41 and AZ91 in buffered Hank's solution. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25(2):329–45.
- [37] Aghion EE, Arnon A, Atar D, Segal G, inventors; Biomagnesium Systems Ltd., assignee. Biodegradable magnesium alloys and uses thereof. WIPO Patent patent WO/2007/125532. 2007 Nov 8.
- [38] Zheng Y, Gu X, Xi Y, Chai D. In vitro degradation and cytotoxicity of Mg/Ca composites produced by powder metallurgy. *Acta Biomater* 2010;6(5):1783–91.
- [39] Mannion PT, Magee J, Coyne E, O'Connor GM, Glynn TJ. The effect of damage accumulation behaviour on ablation thresholds and damage morphology in ultrafast laser micro-machining of common metals in air. *Appl Surf Sci* 2004;233(1–4):275–87.
- [40] Villa JEL, Santos DP, Poppi RJ. Fabrication of gold nanoparticle-coated paper and its use as a sensitive substrate for quantitative SERS analysis. *Mikrochim Acta* 2016;183(10):2745–52.
- [41] Harraz FA, Ismail AA, Bouzid H, Al-Sayari SA, Al-Hajry A, Al-Assiri MS. Surface-enhanced Raman scattering (SERS)-active substrates from silver plated-porous silicon for detection of crystal violet. *Appl Surf Sci* 2015;331:241–7.
- [42] Domingo C, Resta V, Sanchez-Cortes S, García-Ramos JV, Gonzalo J. Pulsed laser deposited Au nanoparticles as substrates for surface-enhanced vibrational spectroscopy. *J Phys Chem C* 2007;111(23):8149–52.
- [43] Stiles PL, Dieringer JA, Shah NC, Van Duyne RP. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu Rev Anal Chem* 2008;1(1):601–26.
- [44] Bauch M, Toma K, Toma M, Zhang Q, Dostalek J. Plasmon-enhanced fluorescence biosensors: a review. *Plasmonics* 2014;9(4):781–99.
- [45] Caldarola M, Albella P, Cortés E, Rahmani M, Roschuk T, Grinblat G, et al. Non-plasmonic nanoantennas for surface enhanced spectroscopies with ultra-low heat conversion. *Nat Commun* 2015;6(1):7915.
- [46] Kelly KL, Coronado E, Zhao L, Schatz GC. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J Phys Chem B* 2003;107(3):668–77.
- [47] Li M, Cushing SK, Wu N. Plasmon-enhanced optical sensors: a review. *Analyst* 2015;140(2):386–406.
- [48] Dong J, Zhang Z, Zheng H, Sun M. Recent progress on plasmon-enhanced fluorescence. *Nanophotonics* 2015;4(1):472–90.
- [49] Homola J, Piliarik M. Surface plasmon resonance (SPR) sensors. *Surface plasmon resonance based sensors*. Springer, Berlin Heidelberg 2006;4:45–67.