

[文章编号] 1000-1182(2010)06-0603-04

新型钛合金2种不同表面处理对成骨细胞早期附着的影响

魏艳萍¹ 张玉梅²

(1.广州军区总医院 口腔科, 广东 广州 510010; 2.第四军医大学口腔医院 修复科, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 研究新型低弹性模量钛合金表面及其微弧氧化及耐磨处理后的表面形貌及粗糙度变化, 以及不同表面处理的成骨细胞附着与2种涂层的表面形貌变化对细胞早期动力学行为影响特征。方法 通过扫描电子显微镜(SEM)观察未处理组不同表面的形貌; 采用SD新生鼠颅骨分离成骨细胞接种在材料表面并进行体外共同培养, MTT法检测30、60、120 min的不同表面的细胞早期附着量; 细胞培养2 h后通过激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察附着细胞的骨架蛋白结构。结果 未处理组、耐磨与微弧氧化组材料表面的粗糙度值依次增加; 细胞早期附着的吸光度A值随材料表面的粗糙度增加呈上升趋势, 各组内3个时间点的细胞附着A值随时间延长而递增; 2 h附着细胞骨架蛋白的量在微弧氧化、耐磨处理组表面表达均优于未处理组。结论 2种不同涂层处理后新合金表面的形貌及粗糙度发生改变, 进而影响到细胞在其表面的早期附着的量及其形态、骨架蛋白的表达。

[关键词] 钛合金; 表面处理; 粗糙度; 成骨细胞

[中图分类号] R 783.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.008

Adhesion of osteoblasts on the novel titanium alloy with bioactivity and wear coating WEI Yan-ping¹, ZHANG Yu-mei². (1. Dept. of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China; 2. Dept. of Prosthodontics, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to evaluate the rugosity with both of the bioactivity and the wear coating of a new type titanium implant material Ti-Zr-Sn-Mo-Nb(TZS), and to investigate the adhesion of osteoblasts on different coating surface. **Methods** Both surface topography of bioactivity and wear coating were examined with scanning electron microscope(SEM). The average roughness of two kinds coating were measured by portable roughometer. We examined the dynamic behavior of early adhesion of the osteoblasts, which were cultured on different coating surface of titanium alloy. As a marker of cell adhesions, cytoskeleton proteins were tagged by F-actin agent. Additionally, the number of adhesion cells was investigated by biological assay MTT. These results were compared with those founds in the control. **Results** Bioactivity-coating with pore structure and wear-coating with irregular pitting corrosion were observed. Roughometer examination revealed that the roughness of different disc was increased. The control bioactivity-coating surface was the most rough, followed by wear-coating and then the control. Bioactivity coating had best cell biocompatibility, in that the highest cell adhesion ratio was detected. It was very likely that bioactivity coating possessed of biomimetic character and roughness surface. Wear coating had similar biocompatible in comparison with bioactivity coating. The cytoskeleton protein of cell formed a fibrillar structure on bioactivity and wear coating. Cytoskeleton tensin was heterogeneously distributed on variety of surface depending on different surface topography. **Conclusion** The new titanium alloy shows rough surface after surface treatment, and then cell adhesion and morphology, cytoskeleton protein present wea on bioactivity-coating and wear-coating.

[Key words] titanium alloy; surface treatment; roughness; osteoblasts

纯钛及钛合金作为骨内种植体以其优越的生物

学性能及力学性能在医学领域得到广泛应用。新型钛合金Ti-5Zr-3Sn-5Mo-15Nb(TZS)种植体材料选用Ti、Zr、Sn、Nb、Mo等非毒性元素,降低合金弹性模量^[1],继而减弱骨内种植体的应力屏障作用。然而,钛及钛合金种植体植入骨组织后,表面自然生成具有生物惰性的氧化层,其界面不会造成周围骨组织

[收稿日期] 2009-11-20; [修回日期] 2010-02-20

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)基金资助项目(2002-AA326070)

[作者简介] 魏艳萍(1975—),女,甘肃人,主治医师,硕士

[通讯作者] 张玉梅, Tel: 029-84766126

坏死,也不与骨组织发生化学性结合,而是与骨组织产生骨融合现象。为了改善钛合金种植体与周围骨组织间的结合性,本课题组利用微弧氧化技术使钛合金材料表面生成多孔纳米氧化钛基复相生物活性涂层;且针对人工关节类种植体对耐磨性的要求,在新钛合金表面进行氮化钛硬质涂层处理。以往动物和细胞实验证明新钛合金及其表面2种涂层处理具有良好的生物安全相容性^[2-3]。作为骨内种植材料,其表面的物理和化学特性,如亲水性、粗糙度和表面结构、化学组成、电荷以及形貌对组织细胞的黏附行为具有重要的影响作用。相关文献指出细胞的反应行为与材料表面粗糙程度关系密切^[4]。本实验研究针对新型钛合金种植材料表面微弧氧化、耐磨涂层处理后,观测其表面形貌及粗糙度变化,并观察处理表面对成骨细胞早期附着行为的影响。

1 材料和方法

1.1 试样的制备

将新型研制钛合金TZS圆片表面进行微弧氧化和耐磨涂层(等离子渗氮处理,由西安交通大学材料研究院完成),材料为直径14.5 mm,厚度1 mm的圆片,实验材料分为3组,微弧氧化组、耐磨组及对照组(将TZS表面抛光处理作为对照)。各组试样采用丙酮2 h,无水乙醇1 h,双蒸水2 h依次超声清洗。培养细胞前采用高温高压法灭菌处理。

1.2 材料表面形貌

将微弧氧化、耐磨涂层处理及对照组进行扫描电镜观察材料表面形貌,放大倍数为500倍。采用JSM-840型电子扫描显微镜(scanning electron microscope, SEM)(Jeol公司,日本)检测。

1.3 材料表面粗糙度

采用TR240型便携式粗糙度测量仪(北京时代集团公司),每组试样重复测量6次。测量点0.8 mm,每次5个测量点,测量范围误差±20~60 μm,粗糙值误差为0.02 μm, R_a 为平均粗糙度, R_q 为各高点均方根, R_z 为微观不平度十点高度。

1.4 细胞培养及早期附着实验

取SD大鼠颅盖骨组织,分离成骨细胞并培养进行细胞实验。细胞培养液为450 g·mL⁻¹基本培养基DMEM,磷酸盐缓冲液PBS,2 mmol·L⁻¹谷氨酰胺,50 mL·L⁻¹的胎牛血清(杭州四季青公司)和抗生素(50 μg·mL⁻¹的链霉素和50 U·mL⁻¹青霉素)。成骨细胞原代培养至第7天,在OLYMPUS-CK40相差显微镜(奥林巴斯公司,日本)下观察,成骨细胞形态呈梭形或三角形,并伸出数量不等、长短不一、形态各异的突起,呈集落化生长趋势^[5]。

将微弧氧化、耐磨处理组与对照组试样置入24孔培养板内,且细胞接种于材料表面,接种密度每毫升4×10⁴个,每孔加入1 mL含血清DMEM培养液继续培养。在30、60、120 min点终止细胞培养,加入5 mg·mL⁻¹ MTT溶液每孔80 μL,37 °C继续孵育4 h,终止培养,弃上清,加DMSO每孔600 μL,振荡10 min。将100 μL移入96孔板用酶联免疫仪在490 nm波长处测吸光度A值。

1.5 细胞骨架蛋白免疫荧光染色

同细胞早期附着实验方法接种细胞,2 h后用PBS洗样3次,然后用20 g·L⁻¹多聚甲醛固定20 min,用2 mL·L⁻¹ Triton X100在室温下处理细胞15 min。用含10 g·L⁻¹牛血清白蛋白的PBS洗样20 min,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(Sigma公司,美国)标记IgG抗体在室温下作用60 min,水洗,碘化丙啶(propidium iodine, PI)(Beckman Coulter公司,美国)标记DNA-prep作用15 min,水洗,甘油封片。标记的细胞采用激光共聚焦扫描电镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)(奥林巴斯公司,日本)检测。

1.6 统计方法

用SPSS 10.0统计分析软件对30、60、120 min的细胞附着量检测结果进行统计分析, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表面形貌特征

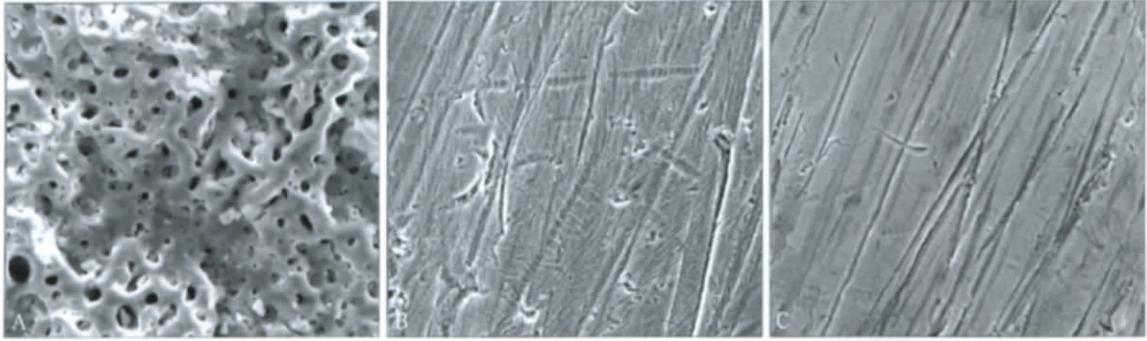
SEM结果(图1)示,微弧氧化涂层表面呈蜂窝状孔隙,大小不一,直径3~5 μm不等,孔隙率30%~40%,孔隙外周突起,中心凹陷,似火山丘状。耐磨涂层表面呈粗细、方向不规则粗糙纹理,细小微孔0.2~0.5 μm不一致。对照组表面除去砂纸打磨痕迹,基底较均匀一致。

2.2 表面粗糙度

粗糙度结果均值显示:对照组 $R_a=0.266$, $R_q=0.341$, $R_z=1.137$;耐磨组 $R_a=0.418$, $R_q=0.612$, $R_z=2.185$;微弧氧化组 $R_a=1.445$, $R_q=1.784$, $R_z=6.286$ 。

2.3 细胞早期附着实验

细胞在实验组及对照组表面培养,3个时间(30、60、120 min)点的附着吸光度A值(图2):1)随着时间延长,细胞附着量增加;2)在相同时间点,对照、耐磨及微弧氧化组依次细胞贴壁数量增多。培养30、60 min时,微弧氧化组明显高于其他组($P < 0.05$);120 min时微弧氧化组、耐磨组明显高于对照组($P < 0.05$)。



A: 微弧氧化组; B: 耐磨处理组; C: 对照组。

图1 不同处理组材料表面形貌 SEM ×500

Fig 1 Surface morphology of disc with different treatments SEM ×500

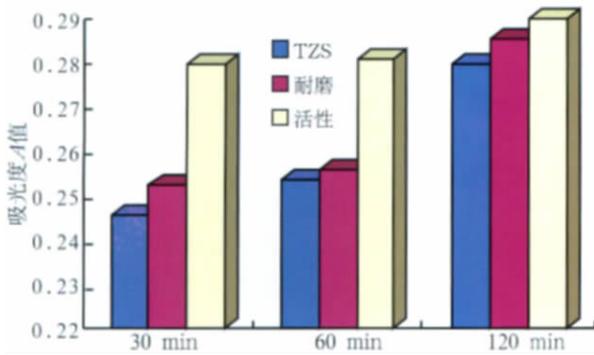
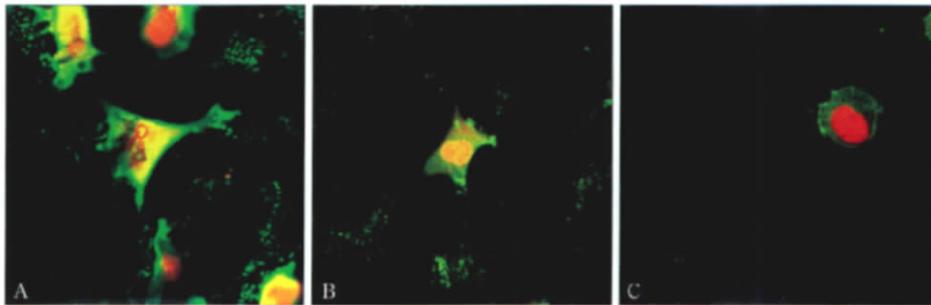


图2 不同处理组3个时间点细胞附着吸光度值

Fig 2 Absorbance values of osteoblasts on samples at 3 time point in different groups

2.4 细胞骨架蛋白形态

在CLSM下观察细胞在对照组、微弧氧化组、耐磨组3组的附着形态(图3),可见细胞核蛋白显红色荧光,骨架蛋白显绿色荧光。细胞在各组材料表面,细胞核均丰满,但光滑对照组材料表面细胞骨架未完全伸展,呈“煎蛋”样圆形;耐磨涂层表面细胞骨架伸展良好,约为四边形;微弧氧化涂层表面细胞不仅细胞骨架伸展良好,且有少许细胞伪足伸出,呈不规则形态。由此可见,2 h附着细胞骨架蛋白的量在微弧氧化、耐磨处理组表面的表达均优于未处理组。



A: 对照组; B: 微弧氧化组; C: 耐磨组。

图3 处理2 h后细胞附着形态 CLSM ×500

Fig 3 The cell morphology after 2 h culture and staining CLSM ×500

3 讨论

口腔生物材料植入人体后首先是材料界面与血液、组织液相接触,再与机体组织细胞相接触。当细胞与生物材料发生接触时,细胞开始发生系列顺序反应,即细胞的附着、伸展与迁移,这也是成骨细胞在材料表面存活的关键。由于这一特点,细胞在材料表面的生物学行为可以作为评价种植体材料的生物相容性^[6]。骨细胞的黏附贴壁量、形态在不同材料表面将会表现各异,根据这一差异细胞早期附着可作为评价材料生物性能的一种检测指标。

本文研究了新低弹性模量钛合金经表面处理,通过接种成骨细胞在不同表面处理的钛合金表

面共同体外培养,观察材料表面形貌及粗糙度变化及其对成骨细胞早期附着行为的影响。实验结果显示,TzS经过不同表面处理,表面形貌及粗糙度均有变化:微弧氧化组表面呈蜂窝状孔隙,大小不一,孔隙外周突起,中心凹陷,似火山丘状;耐磨涂层表面呈粗细、方向不规则粗糙纹理。与对照光滑组($Ra=0.266$)相比,耐磨涂层($Ra=0.418$)平均粗糙度超过1.5倍;微弧氧化涂层($Ra=1.445$)粗糙度值是耐磨涂层的3倍。细胞实验结果表明:1)细胞在微弧氧化及耐磨涂层组表面附着量在各测试点均高于对照组。2)CLSM观察2 h细胞核及骨架蛋白染色,显示对照组表面细胞贴壁但未完全伸展,耐磨涂层表面细胞伸展较好,微弧氧化涂层表面细胞伸展良好

并有丝状伪足突起。Degasne等^[7]于1999年的研究亦表明,材料表面平均粗糙度在细胞黏附过程中起到了决定性的作用。Bowers等^[8]在平均粗糙度为0.14~1.15 μm的纯钛及经改性后的纯钛表面进行了鼠类成骨细胞培养,在细胞种植后分别于15、30、60、120 min对细胞黏附情况进行了测量。在15 min时,细胞在所有表面的黏附情况并没有显著性差异,而在30、60、120 min观察到在平均粗糙度为0.87 μm经喷砂处理的纯钛表面细胞黏附比例最高。细胞骨架蛋白在不同形貌材料表面表达亦不同,包括骨架的排列、方向及骨架形式,其不同进而又影响到整合素β1形成微丝状黏附的能力^[9]。本实验细胞附着结果中微弧氧化组显著高于耐磨组及对照组,推测除了生物活性作用(含钙磷氧化钛生物薄膜结构^[10]),还可能与材料表面粗糙度改变有关,这也可以解释耐磨组略高于对照组的原因。

[参考文献]

[1] 余振涛,周廉,王克光.生物医用β型钛合金的设计与开发[J].稀有金属快报,2004,23(1)8-13.
YU Zhen-tao, ZHOU Lian, WANG Ke-guang. Designation and development of biologic medical β-type titanium alloy[J]. Rare Metal Materials Engineering, 2004, 23(1)8-13.

[2] 许智轩,张玉梅,王忠义,等.医用新型钛合金的口腔刺激试验[J].稀有金属材料与工程,2006,35(1):110-113.
XU Zhi-xuan, ZHANG Yu-mei, WANG Zhong-yi, et al. Stimulation test of oral mucosa about novel medical titanium alloy[J]. Rare Metal Materials Engineering, 2006, 35(1):110-113.

[3] 魏艳萍,张玉梅,赵彦涛,等.粗化处理对新型骨植入钛合金的生物相容性影响[J].华西口腔医学杂志,2007,25(6)529-531,535.
WEI Yan-ping, ZHANG Yu-mei, ZHAO Yan-tao, et al. Studying

the biocompatibility of implant titanium alloy after surface treatment by sandblasting and etching[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(6)529-531, 535.

[4] 张玉梅,魏建化,赵敏民,等.钛表面碱液处理后表面能的变化及对成骨细胞附着的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2003,13(10)561-564.
ZHANG Yu-mei, WEI Jian-hua, ZHAO Yi-min, et al. Evaluation of change of surface energy of titanium and osteoblast adhesion to titanium after treated with alkali[J]. Chin J Conserv Dent, 2003, 13(10)561-564.

[5] Benayahu D, Kletter Y, Zipori D, et al. Bone marrow-derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype *in vitro* and osteogenic capacity *in vivo*[J]. J Cell Physiol, 1989, 140(1):1-7.

[6] Cai K, Rechtenbach A, Hao JY, et al. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects[J]. Biomaterials, 2005, 26:5960-5971.

[7] Degasne I, Basle MF, Demais V, et al. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells(SaOS-2) on titanium surfaces [J]. Calcif Tissue Int, 1999, 64(6)499-507.

[8] Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro* [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 1992, 7(3)302-310.

[9] Lüthen F, Lange R, Becker P, et al. The influence of surface roughness of titanium on β1- and β3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells[J]. Biomaterials, 2005, 26:2423-2440.

[10] 憨勇,许可为.微弧氧化生成含钙磷氧化钛生物薄膜的结构[J].无机材料学报,2001,16(5)951-956.
HAN Yong, XU Ke-wei. Biofilm with calcium and phosphorus were formed after microarc oxidation [J]. J Inorganic Material, 2001, 16(5)951-956.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第602页)

action ridges that may be essential in the biomineralization process[J]. J Biol Chem, 1996, 271(51)32869-32873.

[12] George A, Hao J. Role of phosphophoryn in dentin mineralization [J]. Cells Tissues Organs, 2005, 181(3/4)232-240.

[13] Kim JW, Simmer JP. Hereditary dentin defects[J]. J Dent Res, 2007, 86(5)392-399.

[14] Boskey AL. Amorphous calcium phosphate: The contention of bone[J]. J Dent Res, 1997, 76(8):1433-1436.

[15] Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, et al. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(20):11846-11851.

[16] Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, et al. Dentin sialophospho-protein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human

dentinogenesis imperfecta type [J]. J Biol Chem, 2003, 278(27):24874-24880.

[17] Haruyama N, Sreenath TL, Suzuki S, et al. Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization[J]. Matrix Biol, 2009, 28(3):129-136.

[18] Onishi T, Ogawa T, Hayashibara T, et al. Hyper-expression of osteocalcin mRNA in odontoblasts of Hyp mice[J]. J Dent Res, 2005, 84(1)84-88.

[19] Davideau JL, Papagerakis P, Hotton D, et al. In situ investigation of vitamin D receptor, alkaline phosphatase, and osteocalcin gene expression in oro-facial mineralized tissues[J]. Endocrinology, 1996, 137(8)3577-3585.

(本文编辑 李彩)