

[文章编号] 1000-1182(2009)06-0592-03

纳米颗粒钛膜对成骨细胞合成功能的影响

巴凯¹ 张静¹ 王虎¹ 刘媛媛¹ 杨振宇¹ 李明霞¹ 李伟¹ 缪竞威²

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.四川大学 原子核科学技术研究所, 四川 成都 610064)

[摘要] 目的 通过对比不同纳米颗粒钛膜表面成骨细胞的合成能力, 评价其生物相容性。方法 采用直流磁控溅射法通过控制温度(常温、100℃、250℃、380℃)构建4级纳米颗粒钛膜, 将SD乳鼠第3代成骨细胞接种于其表面及未镀膜的钛片表面, 对表面成骨细胞上清液中骨钙素(OC)含量进行检测。结果 在7、14 d时, 随着时间的延长, 各实验组和对照组样本表面的细胞上清液中OC含量均增大。在7 d时, 对照组与其他各组相比, OC含量间差异均有统计学意义($P<0.05$)。在14 d时, 100℃实验组表面OC含量增幅最大, 100℃实验组与380℃实验组、对照组、空白组相比, 其差异具有统计学意义($P<0.05$), 250℃实验组与380℃实验组、对照组、空白组相比, 其差异也具有统计学意义($P<0.05$)。结论 钛表面纳米改性有利于其生物相容性, 不同纳米粒径可以影响成骨细胞的合成功能。

[关键词] 纳米结构; 钛膜; 成骨细胞; 骨钙素; 生物相容性

[中图分类号] R 783.1 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2009.06.003

Effect of nano-granule titanium films on synthesis of osteoblasts BA Kai¹, ZHANG Jing¹, WANG Hu¹, LIU Yuan-yuan¹, YANG Zhen-yu¹, LI Ming-xia¹, LI Wei¹, MIAO Jing-wei². (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

[Abstract] **Objective** To compare the synthetic ability of osteoblasts on the surface of different nano-granule titanium films and investigate the correlation between nanophase titanium films and cellular biocompatibility. **Methods** Four different nano-granule titanium films were produced by direct current magnetron sputtering, at ambient, 100℃, 250℃, 380℃ substrate temperature, respectively. Rat osteoblasts were seeded on the surface of four treated groups of titanium film samples and non-treated Ti sample(control group). The production of osteocalcin(OC) in all five groups were detected by using double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The production of OC increased gradually from day 7 to day 14 in all groups. In the control group, it showed significant differences with other five groups on day 7. On day 14, the production of OC in 100℃ group was the highest, and it showed significant differences with 380℃, control group and blank group. In 250℃ group, the production of OC also showed significant differences with 380℃, control group and blank group($P<0.05$). **Conclusion** Titanium with nano-modified surface had good biocompatibility and different nano-granule titanium films could affect the synthesis of osteoblasts.

[Key words] nano-structure; titanium film; osteoblasts; osteocalcin; biocompatibility

20世纪60年代末由Brånemark提出的骨整合概念被认为是界面结合的一种理想状态, 成为目前公认的评价种植体成功与否的标准之一。影响骨整合的因素很多^[1], 其中种植体与种植区骨界面之间的影响一直是研究的热点。种植体的表面特性可以影响其植入后的生物学反应^[2]、界面的骨愈合质量和速度^[3], 对种植体功能的正常行使具有重要意义。因

此对种植体表面进行改性处理, 提高种植体与骨界面之间的结合力, 达到满意的骨整合成为学者们所追求的目标。本实验在直流磁控溅射技术构建4级纳米颗粒钛膜的基础上选择与种植体-骨整合关系密切的成骨细胞作为研究对象, 通过对比其在不同纳米粒度钛膜上骨钙素(osteocalcin, OC)分泌的差异, 评价材料表面对细胞生物合成功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

SD乳鼠颅骨成骨细胞第3代(四川大学口腔疾病

[收稿日期] 2009-05-31; [修回日期] 2009-10-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(10675087和10574095)

[作者简介] 巴凯(1984—), 男, 河南人, 硕士

[通讯作者] 王虎, Tel: 028-85503662

研究国家重点实验室), F12培养基、胰蛋白酶(GIBCO公司, 美国), 96孔羊抗大鼠骨钙素酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(ADL公司, 美国), 十二通道加样枪及原装配套加样头(BRAND公司, 德国), 12孔细胞培养板(BD Falcon公司, 美国), 血球计数板(上海精密仪器仪表有限公司), DX-2500型X射线衍射仪(丹东方圆仪器有限公司), IX70倒置显微镜(OLYMPUS公司, 日本), EL404微量反应板自动洗板机(BIO-TEK公司, 美国), THZ-C恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂), CO₂恒温孵箱(BINDER公司, 德国), KDC-1042低速离心机(安徽科大创新股份有限公司中佳分公司), HTS7000 Plus多孔板高效分析仪(PE公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 样本的制备与分组 应用直流磁控溅射技术通过调节溅射基底处理温度在钛片表面形成纳米粒径不同的钛膜, 并根据温度的不同将样本分为常温、100℃、250℃、380℃实验组及未镀膜的对照组。

1.2.2 样本表面粒径的测量 使用DX-2500型X射线衍射仪进行分析, 所用X射线源为Cu-K α , 功率为40 kV/25 mA, 采用SSC步进扫描, 并通过仪器自带的数据处理及应用软件将分析得到的衍射峰的半高宽度和仪器参数进行计算, 得到不同温度组钛膜表面的晶粒尺寸。

1.2.3 细胞的收集与培养 将实验组与对照组钛片经环氧乙烷消毒后, 置于12孔培养板内备用。在生长旺盛的SD乳鼠第3代成骨细胞培养基中加入37℃预温的0.25%胰蛋白酶1 mL消化, 约5 min后于倒置显微镜下见细胞稍收缩、间隙增大, 加入含血清的F12培养液终止消化。用吸管轻轻吹打直至绝大多数贴壁细胞悬浮, 光镜下用血细胞计数板计数并调整细胞密度为每毫升 5×10^4 个。将细胞悬液接种于12孔培养板内, 实验组和对照组每孔各加入1 mL, 培养板置于37℃恒温孵箱中进行培养。4 h后每孔再各加入培养液0.5 mL, 间隔3 d更换培养液。分别在第7、14天取出样本, 吸取孔内上清液1 mL放入冰浴保存的EP管中, $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min, 提取上清液于新的EP管内, 设三复孔, 每个EP管内上清液含量为300 μL , 密封后置于-20℃冰箱内保存。

1.2.4 OC的检测 本实验应用双抗体夹心酶联免疫法检测不同钛片表面成骨细胞上清液中OC的含量。按照ELISA试剂盒说明书进行操作: 根据HTS7000 Plus分析仪上盘图设计位置, 用十二通道加样枪及配套加样头依次加入50 μL 标准品于6个空白微孔中

(稀释浓度依次为0、2.5、5、10、25、50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 空白孔视为0号标准品, 用医用蒸馏水替代)。分别标记样品编号, 加入50 μL 样品于空白微孔中, 在样品孔中加入生物素标记液10 μL ; 在标准品孔和样品孔中加入酶标记偶合溶液100 μL , (36 \pm 2)℃下孵育60 min, 洗板机反复洗涤5次, 每次静置10~20 s, 在滤纸上印干, 依序每孔加入底物A、B液各50 μL , (36 \pm 2)℃下避光显色15 min, 依序每孔加入终止溶液50 μL , 轻轻振荡混匀。用酶联仪在465 nm波长下依序测量各孔的光密度(A)值。在半对数轴线上建立标准曲线, 以6个标准品的A值作为纵坐标(普通坐标), 相应的标准品浓度作为横坐标(对数坐标), 行logistic曲线拟合。根据待测样品的A值由标准曲线内推出相应的OC浓度。

1.3 统计学分析

应用SPSS 10.0统计软件对数据进行分析, 对OC含量检测结果采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和最小显著差(LSD)法进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米钛膜表面晶粒尺寸

常温组、100℃、250℃、380℃实验组纳米钛膜表面晶粒尺寸(均粒径)分别为: 13.0、15.8、35.5、76.9 nm。

2.2 纳米钛膜表面上清液中OC含量的检测结果

根据绘制的大鼠OC标准曲线, 查得第7、14天各实验组、对照组及空白组细胞上清液中OC浓度(表1)。

表1 实验组、对照组及空白组细胞上清液中OC的含量/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Tab 1 The production of OC in the experiment group, the control group and the blank group/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

组别	细胞上清液中OC含量	
	7 d	14 d
常温组	12.350 \pm 0.447	16.135 \pm 1.848
100℃实验组	12.059 \pm 0.954	18.391 \pm 1.230
250℃实验组	12.929 \pm 1.202	17.405 \pm 0.803
380℃实验组	11.029 \pm 0.476	13.794 \pm 1.060
对照组	9.051 \pm 0.850	14.087 \pm 0.421
空白组	11.576 \pm 1.055	12.916 \pm 1.990

由表1可见, 随着时间的延长, 各实验组和对照组样本表面细胞上清液中OC含量均增大。第7天时, 对照组与其他各组OC含量相比, 其差异均有统

计学意义($P<0.05$), 其中380℃实验组与250℃实验组之间相差最大。第14天时, 100℃实验组细胞上清液中OC含量增幅最大, 其次为250℃实验组与常温组, 3组间差异无统计学意义。100℃实验组与380℃实验组、对照组、空白组相比, 其差异均具有统计学意义($P<0.05$); 250℃实验组与380℃实验组、对照组、空白组相比, 其差异均具有统计学意义($P<0.05$); 常温组与空白组之间差异也有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

钛和钛合金因其良好的机械性能和生物相容性被广泛应用于口腔及外科矫形种植领域。但钛属于生物惰性材料, 生物活性差, 缺乏骨诱导作用, 而通过表面改性则可赋予其生物活性。研究证实, 表面粗化的钛种植体能够获得更高的界面结合强度, 表面纳米级改性能增强磷酸钙盐的沉积, 提高成骨细胞蛋白合成及摄取钙离子的能力^[4]。但对于钛膜纳米粒度与细胞合成功能的关系研究较少。OC是由成骨细胞合成和分泌的一种非胶原性蛋白^[5], 是研究骨代谢的一种特异、灵敏的生化指标, 是成骨细胞功能和骨质矿化的特殊标志物。OC的水平变化与成骨细胞的活性成正相关, 而种植体植入体内能否较快地与骨组织间形成牢固、稳定的骨整合, 最终也是取决于细胞合成及分泌胞外基质, 形成钙化结节的能力。因此本实验通过测定成骨细胞在不同纳米粒径钛膜表面OC的分泌量, 评价其生物相容性。

在前期对纳米颗粒钛膜表面形貌特征的研究中已经证明随着磁控溅射温度的升高, 所生成的钛膜的纳米颗粒尺寸也随之增大, 而材料表面的粗糙度反而减小^[6]。在此实验基础上, 本实验对样本表面成骨细胞的合成能力进行检测, 发现随着时间的延长, 除空白组外的所有组别样本表面OC含量均有大幅度的增加, 体现出钛作为一种理想的人体植入材料与骨组织间良好的生物相容性。在14 d时, 除了380℃实验组样本表面OC含量略小于对照组外, 其余组膜材料均明显高于对照组, 证实了材料表面性

状可以影响OC的分泌, 表面改性处理能促进成骨细胞的合成功能。而380℃实验组小于对照组可能是由于预处理时用碳化硅水砂纸逐级打磨至600目, 得到表面相对光滑但基底仍存在起伏磨痕的钛片, 溅射温度最高的380℃实验组因颗粒尺寸最大, 最后反而使表面粗糙度小于对照组。常温组、100℃实验组和250℃实验组测量值间差异无统计学意义, 100℃与380℃实验组间差异明显, 说明材料表面不同的粗化程度对成骨细胞的合成功能影响明显。在14 d时, 以100℃实验组的上清液中OC含量增幅最大, 可以认为100℃实验组所形成的钛膜的纳米粒径及表面粗糙度较其他各组更有利于OC的合成和分泌, 显示出最佳的成骨细胞合成功能和生物相容性。但在临床应用中, 具有最佳生物相容性的种植体表面膜结构的定量分析还有待于更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, et al. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression[J]. Clin Oral Implants Res, 2005, 16(6): 650-656.
- [2] Bigerelle M, Anselme K, Noël B, et al. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: A new process to increase *in vitro* human osteoblast response[J]. Biomaterials, 2002, 23(7): 1563-1577.
- [3] Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness[J]. Clin Oral Implants Res, 2003, 14(1): 43-48.
- [4] Cai K, Bossert J, Jandt KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006, 49(2): 136-144.
- [5] Price PA, Lothringer JW, Nishimoto SK. Absence of the vitamin K-dependent bone protein in fetal rat mineral. Evidence for another gamma-carboxyglutamic acid-containing component in bone[J]. J Biol Chem, 1980, 255(7): 2938-2942.
- [6] 刘媛媛, 游梦, 王虎, 等. 纳米颗粒钛膜的构建及其表面形貌特征研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(4): 455-458.
LIU Yuan-yuan, YOU Meng, WANG Hu, et al. Construction of nano-granule titanium film and study of its surface topography[J]. West China J Stomatol, 2009, 27(4): 455-458.

(本文编辑 王晴)

《口腔颌面修复学杂志》2010年征订启事

《口腔颌面修复学杂志》由首都医科大学附属北京口腔医院、解放军总医院主办, 涵盖口腔修复专业及相关学科的内容, 欢迎订阅及投稿。本刊已入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊), 中文科技期刊数据库(SWIC)源期刊, 中国学术期刊综合评价数据库源期刊和中国核心期刊(遴选)数据库源期刊。本刊为双月刊, 邮发代号2—424, 定价为每册10元, 全年60元。编辑部地址: 北京市复兴路28号解放军总医院《口腔颌面修复学杂志》编辑部, 邮政编码: 100853; 电话: 010-66936254; 传真: 010-66936254; 网址: <http://www.301dent.com>; E-mail: cnkqxf@301hospital.com.cn。

《口腔颌面修复学杂志》编辑部