

钛表面塑性变形纳米化对 MC3T3 细胞黏附的影响

陶凤娟¹ 余优成^{1Δ} 陈万涛² 万鹏波² 叶冬霞² 于晓平¹ 王庆¹

¹复旦大学附属中山医院口腔科 上海 200032;

²上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科-上海市口腔医学重点实验室 上海 200011)

【摘要】 目的 研究纯钛表面塑性变形纳米化后对小鼠成骨细胞株 MC3T3 细胞黏附等生物学行为的影响。方法 应用塑性变形技术使纯钛表面纳米化,钛板大小 10 mm×10 mm×1 mm。未处理纯钛为对照组($n=6$),塑性变形纳米化钛板为实验组($n=6$)。扫描电镜观察 MC3T3 细胞在材料表面的黏附形态,荧光显微镜检测细胞黏附的数目,应用激光共聚焦扫描显微镜观察细胞骨架肌动蛋白的特点。结果 扫描电镜下观察表明,MC3T3 细胞是以多个大小不等的胞突黏附于纳米化钛板表面,细胞表现良好的伸展形态;荧光显微镜显示,细胞在纳米化钛板表面的黏附能力较表面未处理钛板明显提高($P<0.05$);激光共聚焦扫描显微镜下观察发现,纳米化钛板表面结构能促进细胞骨架肌动蛋白纤维的充分铺展。结论 纯钛表面塑性变形纳米化后,能明显促进 MC3T3 细胞在其表面的黏附和铺展,改善了纯钛的生物相容性。

【关键词】 钛表面; 纳米化; 塑性变形; 成骨细胞黏附; 细胞骨架

【中图分类号】 R 783.1 **【文献标志码】** A

The effects of nanostructured titanium fabricated via surface plastic deformation on MC3T3 cell adhesion

TAO Feng-juan¹, YU You-cheng^{1Δ}, CHEN Wan-tao², WAN Peng-bo²,
YE Dong-xia², YU Xiao-ping¹, WANG Qing¹

¹Department of Stomatology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University-Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of nanostructured titanium fabricated via surface plastic deformation on MC3T3 cell adhesion. **Methods** Nanostructured titanium surface was prepared using plastic deformation method. The nanostructured titanium was examined as experimental group, while the untreated titanium was used as control group. The effects of nanostructured titanium surface on MC3T3 cell adhesion, shape and cytoskeletal structure were examined using scanning electron microscope (SEM), fluorescence microscope and laser confocal scanning microscope (LCSM).

Results The morphological changes observed by SEM showed that MC3T3 cells had better shape on the surface of nanostructured titanium. The nanostructured titanium surface promoted MC3T3 cell adhesion ($P<0.05$). The cells of the experimental group showed more extensive spreading than that of the control group. **Conclusions** The biological behavior of MC3T3 cells on nanostructured titanium.

【Key words】 titanium surface; nanostructure; plastic deformation; cell adhesion; cytoskeleton

牙种植体的表面特性可影响其植入后的生物学效应,决定组织细胞在其表面的黏附、增殖、分化及

矿化,直接影响界面的骨整合,对种植体功能的正常行使十分重要^[1]。

钛已被公认为是口腔种植材料中最好的一种。实验研究和临床应用表明,钛具有良好的生物相容性、理化性质和机械性能,能与骨形成良好的骨整合,植入体的负荷能持续传导并分散到骨组织中,从而行使生物学功能。但钛是一种惰性材料,其结构和性质与骨组织相差较大,与骨形成机械锁合,对机体组织的愈合无明显促进作用,愈合时间较长。因此,进一步增强其骨整合能力,缩短骨整合时间,提高骨整合率,满足机体硬组织修复的严格要求,有必要对钛表面进行改性。钛表面活性化处理技术在欧美少数国家已较成熟,遗憾的是国外种植材料表面处理方法都是技术保密或专利保护,而迄今为止我国研发出来的牙种植体失败率较高,其原因主要是钛种植材料没有和骨形成良好的骨整合。

有学者认为,与普通材料相比,纳米材料表现出优越的生物学特性和理化性质,更有利于组织细胞与材料表面的结合^[2]。皮质骨中的矿化颗粒直径约为 20~50 nm。若种植材料表面特征与其相似,就可能促进骨整合,有利于种植材料表面的骨形成^[3,4]。

表面严重塑性变形(severe plastic deformation, SPD)是使材料纳米化的一种技术,其制备的纳米材料致密,内部无空洞,具有弹性模量与骨组织接近、强度高、耐磨性好等优点^[5]。而有关该方法制备的纳米种植材料的生物学特性研究较少,本实验旨在研究纯钛表面塑性变形纳米化对小鼠成骨细胞株 MC3T3 细胞黏附、铺展和细胞骨架肌动蛋白状态的影响,为塑性变形纳米化新材料的临床应用提供实验基础和理论依据。

材料和方法

主要仪器与试剂 MC3T3 小鼠成骨细胞株(上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科实验室提供);二氧化碳细胞培养箱(SANYO,日本);塑料细胞培养皿和培养瓶(CORNING,美国);DMEM 培养基(Gibco,美国);胎牛血清(FBS,Gibco,美国);胰蛋白酶干粉(活性 1:250,Sigma,美国);青霉素(上海新先锋有限公司,中国);链霉素(华北制药股份有限公司,中国);扫描电镜(scanning electron microscope,SEM QUANTA-200 环境扫描电镜,PHILIP 公司,荷兰);荧光显微镜(fluorescent microscope,FM,Eclipse TE300,Nikon,日本);激光共聚焦扫描显微镜(laser confocal scanning

microscope,LCSM,Leica TCS SP2,德国);罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-Phalloidin,Molecular Probes,美国);图像分析软件(Image-Pro Plus5.0,美国)。

材料制备 应用塑性变形技术在纯钛表面制备纳米结构,然后进行特殊化学处理获得多孔表面特征^[5]。本实验所用纳米化纯钛板和未处理纯钛板大小规格均为 10 mm×10 mm×1 mm,对照组和实验组数目各 6 块,纯度为 99.8%(由上海交通大学材料学院完成)。每次实验前,对照组纯钛和实验组纳米化钛板均用丙酮超声波清洗去油,5%盐酸超声波清洗去除表面污染,再用去离子水清洗 3 遍,高压蒸汽消毒备用。

小鼠成骨细胞株 MC3T3 的传代培养 实验用细胞为 MC3T3 小鼠成骨细胞株。用 DMEM+5% FBS 培养液培养细胞于 25 cm² 大小的一次性塑料培养瓶中,长至 80%~90%,约 1×10⁶ 个/mL 时,PBS 缓冲液冲洗,0.25%胰蛋白酶消化约 2~3 min,镜下见细胞间隙增大,回缩变圆时,用培养液中和终止其消化,吹打制成单细胞悬液,洗涤离心(1 000 r/min,5 min)后,培养液重新悬起制成单细胞悬液,分别传代接种于 2 个大小为 25 cm² 的一次性培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下的二氧化碳细胞培养箱中培养。隔天换液。倒置显微镜下观察细胞形态。

纯钛和塑性变形纳米化纯钛表面形貌检测 采用激光共聚焦扫描显微镜,观察对照组纯钛表面形貌和实验组塑性变形纳米化纯钛表面形貌,拍照、记录。

材料表面细胞黏附形态检测 取消毒后两组钛板放入直径为 60 mm 的一次性培养皿中,接种浓度为 2×10⁴ 个/mL 的 MC3T3 细胞悬液 8 mL 于培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 及 100%湿度的细胞培养箱中培养 3 h 后,取出钛板,用 PBS 缓冲液冲洗去除未黏附细胞,然后样品按以下方式处理:(1)脱水:用系列梯度乙醇(30%、50%、70%、90%、95%、100%)在室温下分别脱水 10 min。(2)干燥:采用六甲基二硅胺烷(HMDS)干燥法进行干燥。首先用 HMDS-乙醇溶液(V₁:V₂=1:2,1:1,2:1)各浸泡 10 min,再用纯 HMDS 浸泡 10 min。(3)观察:采用真空镀膜技术对钛板表面喷金,然后在 SEM 下观察。

材料表面细胞黏附计数 取消毒后两组钛板放入直径为 60 mm 的一次性培养皿中,接种浓度为 5×10⁴ 个/mL 的 MC3T3 细胞悬液 8 mL 于培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 及 100%湿度培养箱中培养

3 h 和 6 h 后,分别转移至直径为 35 mm 的一次性培养皿中,弃去培养液,PBS 缓冲液冲洗去除未贴壁细胞,然后加入 4% 中性多聚甲醛室温固定 10 min,PBS 缓冲液清洗,EB 避光染色 3 min,PBS 缓冲液清洗 2 次,5% 甘油封片,荧光显微镜下观察、拍照,图像分析软件计数。

MC3T3 小鼠成骨细胞骨架肌动蛋白检测 取消毒后两组钛板放入直径为 60 mm 的一次性培养皿中,接种浓度为 5×10^4 个/mL 的 MC3T3 细胞悬液 8 mL,置于 37°C ,5% CO_2 及 100% 湿度培养箱中培养 6 h 后,终止培养,转移至直径为 35 mm 一次性培养皿中,PBS 缓冲液清洗,加入 4% 中性多聚甲醛,室温固定 10 min 后放至 4°C 冰箱过夜。PBS 洗 3 次,0.1% triton 处理 30 min,PBS 清洗 2 次,封

闭液封闭 60 min,PBST 清洗 2 次,罗丹明-鬼笔环肽室温下避光染色 10 min,PBST 洗 2 次,荧光封闭剂封片,激光共聚焦显微镜观察、拍照记录。

统计学处理 采用 SAS 6.0 软件包对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

激光共聚焦扫描显微镜检测纯钛和塑性变形纳米化纯钛表面形貌 激光共聚焦扫描显微镜检测结果显示,对照组纯钛表面较为光滑(图 1A),而实验组塑性变形纳米化纯钛的表面出现致密且不在一个层面的陷窝,形成特殊的孔隙状纳米结构(图 1B)。

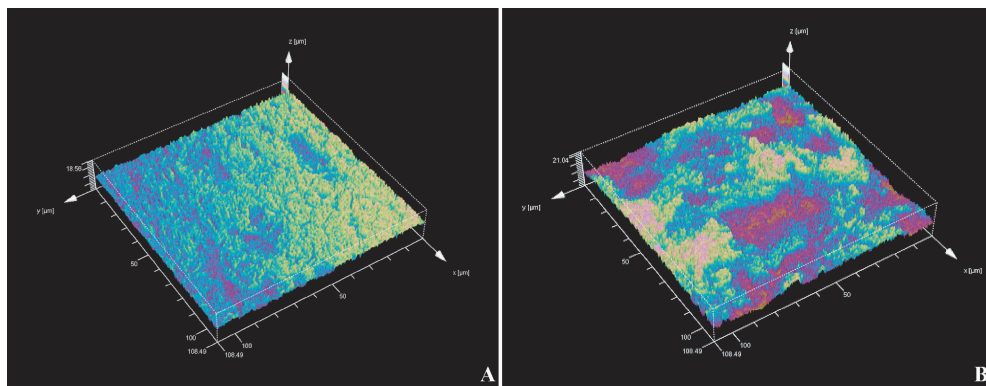


图 1 激光共聚焦扫描显微镜检测 2 组材料表面形貌 ($\times 400$)

Fig 1 LCSM images of surfaces of two samples ($\times 400$)

A: Untreated titanium; B: Nanostructured titanium

扫描电镜检测材料表面细胞黏附形态 扫描电镜下,未处理纯钛表面 MC3T3 小鼠成骨细胞呈球形,说明细胞还没有真正形成比较牢靠的生物学黏附,细胞机械贴附在纯钛表面,这种黏附不稳定,易

脱落(图 2A)。而纳米化钛板表面,细胞大多已经伸展,细胞呈扁平状,不规则并有较多突起,可见细胞的突起长入纳米级的孔隙内,表明细胞已经形成生物学黏附(图 2B)。

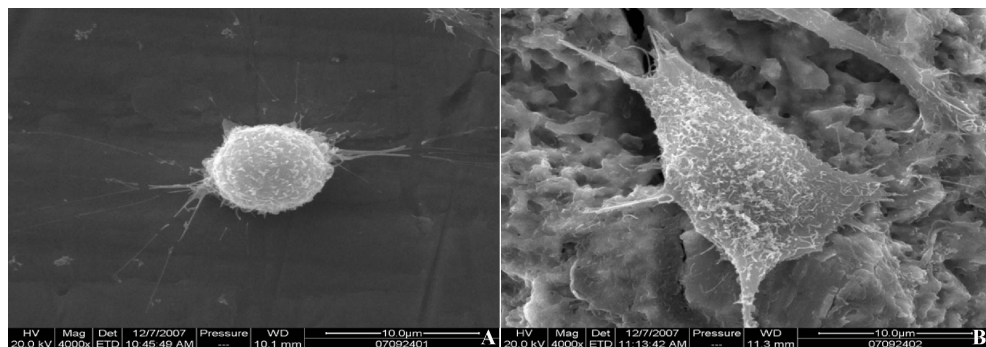


图 2 扫描电镜检测纯钛和纳米化钛板表面细胞黏附形态

Fig 2 SEM images of shape of cell adhesion on nanostructured titanium and untreated titanium

A: Control group; B: Experimental group

荧光显微镜检测钛板表面细胞黏附计数 荧光显微镜观察显示,MC3T3 细胞分别接种于纯钛和

纳米化钛板表面 3 h 和 6 h 后,其细胞的数目与形态均有明显差异,实验组(图 3B、D)的细胞数目多

于对照组(图 3A、C),细胞铺展程度较对照组明显,应用图像分析软件计数和统计软件对细胞黏附数目

进行单因素方差分析,结果表明各组之间有显著性差异(图 4)($P < 0.05$)。

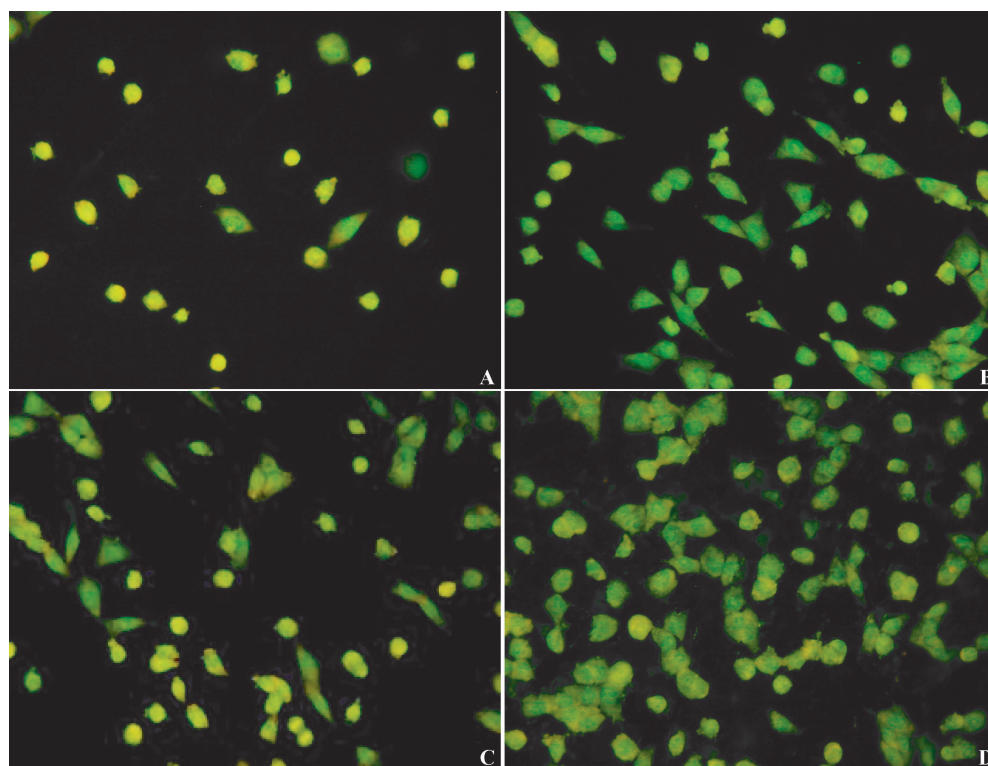


图 3 荧光显微镜观察钛板表面黏附的 MC3T3 细胞($\times 200$)

Fig 3 Fluorescence micrographs of MC3T3 cell adhering to different titanium surfaces($\times 200$)

A:Control group 3 h; B:Experimental group 3 h; C:Control group 6 h; D:Experimental group 6 h

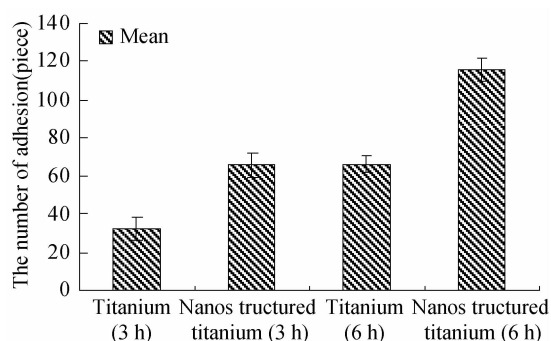


图 4 两组材料表面 3 h 和 6 h MC3T3 细胞黏附数量

Fig 4 Number of attached MC3T3cell on two sample surfaces for 3 h and 6 h

MC3T3 细胞骨架肌动蛋白检测 MC3T3 细胞接种于含纯钛和纳米化钛板的一次性培养皿中培养 6 h,用激光共聚焦显微镜检测,在对照组中,可见肌动蛋白纤维多在细胞膜周围分布,呈车轮样排列,细胞多数成圆形、椭圆形,铺展面积小(图 6A、B、C)。在纳米化组材料表面,肌动蛋白纤维出现不规则伸展,部分细胞出现可以辨别的张力纤维肌丝,细胞伸展较为充分(图 6D、E、F)。用 Leica TCS 软件随机测量每个视野中 12 个细胞的铺展面积,检测结果表明塑性变形钛板表面细胞的铺展面积大于对照组

(图 5),有统计学差异($P < 0.05$)。

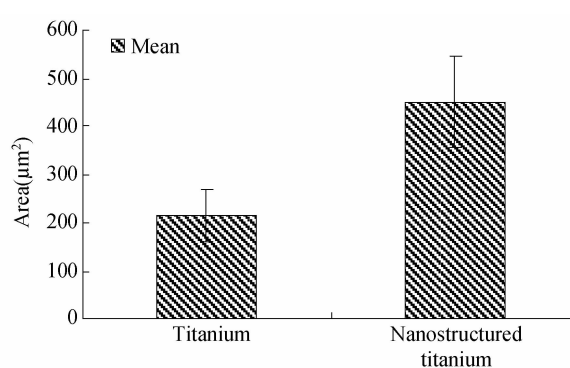


图 5 细胞铺展面积的检测结果

Fig 5 Area of cell spreading on titanium and nanostructured titanium

讨 论

种植材料植入体内后,其表面与组织细胞首先发生接触。因此,材料表面特性对成骨细胞的黏附起着非常重要的作用,而黏附是成骨细胞发挥作用的前提,成骨细胞首先要黏附于材料后才能增殖、迁移、分化和分泌钙基质^[6]。提高种植材料生物相容

性最经济有效的方法是表面修饰^[7]。其中纳米表面 形貌修饰法由于材料细化所产生的小尺寸效应、表

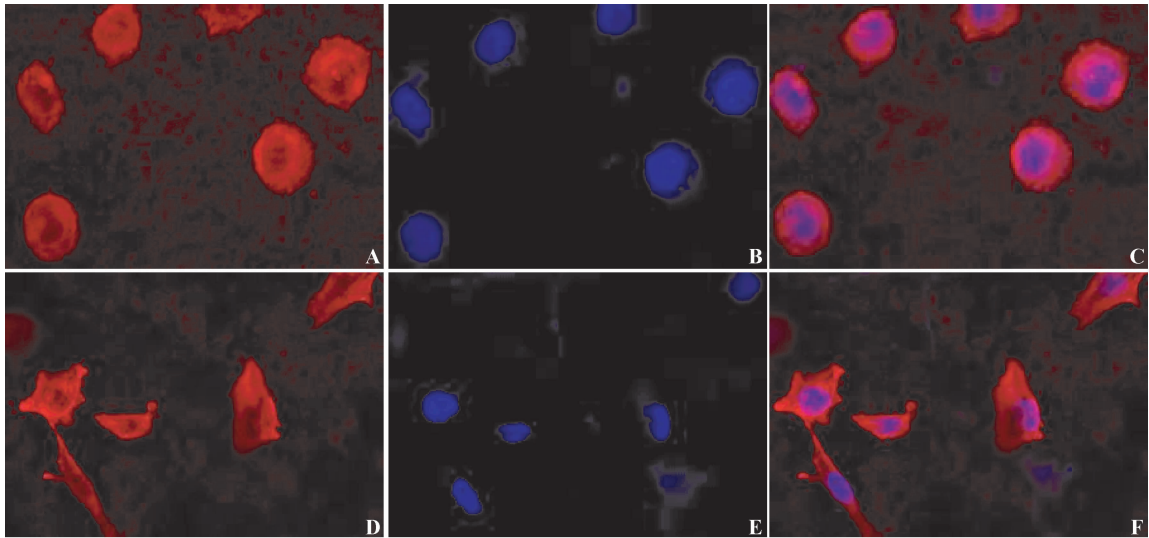


图6 激光共聚焦显微镜检测细胞骨架肌动蛋白形态($\times 630$)

Fig 6 LCSM micrographs of cell skeleton adhering to the surfaces of two samples($\times 630$)

A(actin),B(caryon),C(actin and caryon):Control group; D(actin),E(caryon),F(actin and caryon):Experimental group

面效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应等使纳米材料表现出许多不同于常规材料的特性^[8],如纳米化后明显增加的粗糙度为成骨细胞的早期黏附提供了更多面积;小尺寸及界面效应增加的比表面积,增强了表面活性,促进了成骨细胞与材料的黏附^[9]。本实验采用 SPD 技术获得的材料表面为纳米晶,中心内部仍保持大晶体特征,晶粒尺寸从表面至中心呈梯度结构,内部致密无空洞,SPD 处理 60 min 时,纯钛表面粗糙度为 50~100 nm^[10]。

骨整合是种植体植入后,与骨组织的最佳结合状态,其定义为:有序的活的骨组织与负荷的种植体间结构和功能性连接^[11]。而影响骨整合的因素是多方面的,成骨细胞在材料表面的黏附,继而增殖分化是形成骨整合的前提。材料表面的粗糙度会增加其与组织细胞的接触,种植材料植入体内后,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白会在材料表面形成一层生物大分子层,与分布于细胞表面的整合素(Integrins)相互作用,介导细胞黏附。

整合素分子能特异性地识别细胞外基质中的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列,将胞外的 ECM 分子与胞内的骨架蛋白连接起来形成“ECM-整合素-细胞骨架蛋白”焦点黏附物,其是整合素信号传导的结构基础^[12],传导细胞内外之间的双向信号。整合素与胞外配体结合把胞外信号传入胞内,导致细胞骨架重组,细胞形态改变,这是由外向内的信号过程(outside in signaling);另一方面,来自胞内的信号也能经过整合素传导,从而调节整合素与配体的亲和力,这是由内至外的信号过程

(inside out signaling)^[13]。

种植体表面特性会影响细胞黏附,从而影响细胞分化、基质分泌及组织愈合,直接关系到临床种植的成功与否^[14]。细胞的初期黏附,是细胞铺展、增殖和分化的前提。本实验的扫描电镜结果显示,在纳米化纯钛表面细胞大多已经伸展开来,细胞呈扁平状,不规则并有较多突起形成,可见细胞的突起长入纳米级孔隙内,这种形成生物学黏附的细胞,比较牢靠,不易脱落。荧光免疫显微镜可以检测到,细胞在未处理纯钛表面数目较少,多呈现圆缩状,而在纳米化钛板表面的数目明显较多,并开始铺展。说明纳米化促进了细胞的初期黏附。

细胞黏附于材料后,开始铺展。焦点粘着物在双向信号传导的过程中,重组肌动蛋白骨架,形成应力纤维,细胞变平、铺展^[13]。激光共聚焦显微镜检测,细胞培养 6 h 后可见塑性变形纳米化钛板表面细胞的铺展面积大于纯钛组。纯钛表面,可见肌动蛋白纤维集中在细胞膜周围无规律排列,细胞呈圆形或椭圆形,铺展面积小;而在塑性变形纳米化钛板表面,可见大量细胞的肌动蛋白纤维不规则伸展,有可辨别的张力丝,张力丝布满细胞,细胞伸展更加充分。说明塑性变形纳米化能促进细胞肌动蛋白重组功能,使细胞铺展更好。

本实验选用小鼠成骨细胞株 MC3T3 作为研究对象,观察成骨样细胞在塑性变形纳米化纯钛表面的黏附和铺展特性,这种表面纳米化技术可以促进细胞的初期黏附和随后的细胞铺展,改善了纯钛的生物相容性,有望成为种植材料新的表面形貌修饰

方法。

参 考 文 献

- [1] Cooper LF, Masuda T, Whitson SW, *et al.* Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1999, 14(1): 37 - 47.
- [2] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, *et al.* Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3): 475 - 483.
- [3] Popat KC, Leary Swan EE, Mukhatyar V, *et al.* Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(22): 4 516 - 4 522.
- [4] Price RL, Gutwein LG, Kaledin L, *et al.* Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 67(4): 1 284 - 1 293.
- [5] Zhang XN. Biomechanical and biocorrosion properties of nanostructured titanium[J]. *Advanced Mater Res*, 2007, 29 - 30: 51 - 54.
- [6] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, *et al.* Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(11): 1 327 - 1 333.
- [7] Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics[J]. *Biomaterials*, 1999, 20(13): 1 221 - 1 227.
- [8] 宋文植, 刘晓秋, 孙宏晨, 等. 口腔纳米材料研究进展[J]. *国外医学: 口腔医学分册*, 2003, 30(6): 470 - 471.
- [9] Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, *et al.* Different titanium surfaces modulate the bone phenotype of Saos-2 osteoblast-like cells[J]. *Eur J Histochem*, 2004, 48(3): 213 - 222.
- [10] 万鹏波, 陈万涛, 贺捷, 等. 纯钛表面塑性变形纳米化对 Saos-2 细胞生物学行为的影响[J]. *上海口腔医学*, 2008, 17(2): 151 - 157.
- [11] Branemark PI. Biologic and clinical evaluation of infrared thermography[J]. *J Radiol Electrol Med Nucl*, 1967, 48(1): 69 - 76.
- [12] Roy S, Ruest PJ, Hanks SK. FAK regulates tyrosine phosphorylation of CAS, paxillin, and PYK2 in cells expressing v-Src, but is not a critical determinant of v-Src transformation[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 84(2): 377 - 388.
- [13] Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(20): 3 563 - 3 571.
- [14] Okumura A, Goto M, Goto T, *et al.* Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cell (Saos-2) [J]. *Biomaterial*, 2001, 22(16): 2 263 - 2 271.

(收稿日期: 2008 - 11 - 03; 编辑: 张秀峰)