

钛表面碱热处理构建聚多巴胺膜层对细胞黏附的影响

尤莹, 卜寿山*, 庄海, 陈飞扬, 张继生

南京医科大学第一附属医院口腔科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:研究碱热处理后多孔钛表面聚多巴胺黏附羟基磷灰石的复合涂层制备及其对大鼠骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化能力的影响。评价碱热处理后多孔钛表面聚多巴胺黏附羟基磷灰石复合涂层作为种植体表面改性方法的作用。方法:通过多巴胺的自聚合在碱热处理后的多孔钛表面构建聚多巴胺(PDA)膜层,利用聚多巴胺的黏附性能将纳米级羟基磷灰石颗粒黏附至多孔钛表面,形成多孔钛表面聚多巴胺黏附羟基磷灰石的复合涂层,通过扫描电子显微镜(SEM)分析表面结构特征。分离培养SD大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),采用SEM观察细胞黏附情况,并利用Cell Counting Kit-8(CCK-8)、碱性磷酸酶(alkaline phosphates, ALP)等检测其增殖、分化能力。结果:该改性方法成功在多孔钛表面形成聚多巴胺复合涂层。体外细胞实验表明该复合涂层对BMSCs生长无抑制作用,且对其黏附和早期增殖有明显促进作用。结论:碱热处理后多孔钛表面形成的聚多巴胺生物活性复合涂层对BMSCs的黏附和早期增殖有明显的促进作用。

[关键词] 钛表面;多巴胺;羟基磷灰石

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)06-833-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180624

The effects of alkali - heated titanium surfaces with dopamine adhering hydroxyapatite coating on the adhesion of cells

You Ying, Bu Shoushan*, Zhuang Hai, Chen Feiyang, Zhang Jisheng

Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of bioactive composite layers on porous titanium (Ti) surfaces with dopamine adhering hydroxyapatite coating on rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods:** Coating the Ti with dopamine, the modified surface to increase the hydroxyapatite (HA)'s adhesion onto the titanium implant surface which has porous structure treating with the alkali-heat to form bioactive composite layers. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were employed to investigate the surface evolution of titanium after the chemical surface treatment and HA adhesion. Bone marrow derived stem cells (BMSCs) were cultured and initial cell attachment, morphology, proliferation were evaluated. **Results:** The bioactive composite layers on porous titanium surfaces with dopamine adhering hydroxyapatite coating was successfully prepared. The bioactive composite layers were applied *in vitro*, the growth of BMSCs was not inhibited on it. **Conclusion:** The bioactive composite layers significantly promote the adhesion and early proliferation of BMSCs *in vitro*. This finding shows that the proposed method demonstrates a good prospective application in surface modification of titanium.

[Key words] titanium surface; dopamine; hydroxyapatite

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06): 833-837]

纯钛由于其稳定的生物相容性和优越的机械性能,在口腔种植修复中常常作为种植体的首选材料。

[基金项目] 国家自然科学基金(81670967);江苏省卫生厅面上项目(H201504);江苏省“六大人才高峰”第八批高层次人才项目(WSW-021)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: bushsh@vip.sina.com

料。纯钛属于生物惰性材料,为提高纯钛表面的生物活性促进其与骨的结合,人们常常对纯钛表面进行改性处理^[1]。羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)其化学结构与人体骨组织相似,具有良好的生物相容性和骨引导作用,能促进早期骨结合。而单纯的HA涂层种植体结合强度不够,远期稳定性不佳^[2]。

纯钛表面的碱热处理能够为纯钛表面提供纳米级的微孔结构,而聚多巴胺因其具有类似于生物黏附分子左旋多巴(3,4-dihydroxyphenyl L-alanine, L-dopa)的结构,有着惊人的黏合性能和机械性能,可黏附在任何物体的表面^[3-4]。本研究通过多巴胺的自聚合在碱热处理多孔钛表面构建聚多巴胺(polydopamine, PDA)膜层,利用聚多巴胺的黏附性能将纳米级羟基磷灰石颗粒黏附至多孔钛表面,形成多孔钛表面聚多巴胺黏附羟基磷灰石的复合涂层,通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)分析表面结构特征。分离培养SD大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),采用SEM观察细胞黏附情况,并利用Cell Counting Kit-8(CCK-8)、碱性磷酸酶(alkaline phosphates, ALP)等检测其增殖、分化能力。结合实验数据客观评价多孔钛表面聚多巴胺黏附羟基磷灰石复合涂层作为种植体表面改性方法的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

直径14 mm、厚0.25 mm圆形纯钛片(纯度99.99%,东莞市辉钛金属材料有限公司),扫描电镜(LEO 1530 VP场发射扫描电镜,德国),电阻炉(SX-5-12S北京永光明牌箱式电阻炉),酶联免疫检测仪(Bio-Rad公司,美国); α -MEM培养基(Hyclone公司,美国),胰蛋白酶(Gibco公司,美国),胎牛血清(Gibco公司,美国),PBS(Hyclone公司,美国),CCK-8试剂盒(同仁公司,日本),碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成);氢氧化钠(NaOH)、丙酮、无水乙醇、纳米羟基磷灰石、盐酸多巴胺等常规试剂均为分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 钛表面预处理

表面光滑的纯钛片72枚,试件依次在丙酮、无水乙醇、去离子水中超声荡洗15 min,干燥备用。制备好的试件称为光滑(pure Ti, PT)组。

1.2.2 碱热处理

随机从PT组中选取48枚试件,浸泡于60℃、5 mol/L NaOH水溶液中,24 h后取出试件,去离子水冲洗,干燥。将NaOH处理后的试件放入每分钟上升5℃的电阻炉中600℃恒温加热1 h,随炉自然冷却,去离子水中超声荡洗15 min,干燥备用。制备好的试件称为碱热(AH)组。

1.2.3 聚多巴胺涂层黏附纳米羟基磷灰石

随机从AH组中选取24枚试件,浸入到pH为

8.5浓度为2 mg/mL的盐酸多巴胺溶液中反应16 h,去离子水超声10 min,干燥,然后浸入1 mg/mL纳米羟基磷灰石溶液中反应16 h,去离子水超声15 min,干燥备用。制备好试件称为聚多巴胺涂层黏附羟基磷灰石(PDA-HA)组。

1.2.4 表面形貌及表面元素分析

各组试件中随机选取3枚试件,SEM观察试件表面形貌、X射线能量色散谱仪(energy dispersive spectrometer, EDS)分析试件表面元素组成。

1.2.5 体外细胞学评价

1.2.5.1 大鼠BMSCs的培养

BMSCs的分离和培养方法参照Sugiura等2004年报道的方法进行^[5]。原代培养:采用全骨髓贴壁法进行大鼠BMSCs的体外分离培养。选用3周龄雄性SD大鼠(南京医科大学动物实验中心提供)。将大鼠断颈处死后,取出股骨和胫骨,剪去两端骨骺,显露骨髓腔,使用 α -MEM培养基冲洗大鼠胫骨和股骨骨髓腔,制成含BMSCs的细胞悬液,培养皿内培养。传代培养:当原代细胞铺满培养瓶底面80%~90%时,按1:2传代,第3~4代用于后续实验。

1.2.5.2 细胞接种

第3~4代BMSCs常规培养,待其铺展到80%~90%时,终止培养,PBS冲洗,胰酶消化,制备细胞悬液,按 4×10^4 个/mL、500 μ L/孔接种至试件表面(环氧乙烷灭菌),添加500 μ L完全培养基,继续培养。

1.2.5.3 细胞形态学观察

培养24 h后,随机从3组试件中各选取3枚, PBS漂洗,2.5%戊二醛固定,酒精脱水、干燥、表面喷金,SEM下观察各组试件表面的细胞形态。

1.2.5.4 CCK-8检测

细胞接种后第1、4、7天各选取3枚试件,吸去培养基,PBS漂洗,试件置于新的24孔板中,每孔加入500 μ L完全培养基,50 μ L CCK-8,37℃孵育4 h,待培养基变色,终止培养,每孔吸100 μ L液体至96孔板中,酶标仪测定吸光度值(波长450 nm)。

1.2.5.5 ALP活性测定

细胞接种后第1、4、7天各选取3枚试件,去培养基,漂洗,每孔加入500 μ L浓度为0.2%的Triton X-100,30 min后取10 μ L细胞裂解液于新24孔板,分别加入100 μ L基质液、100 μ L缓冲液,混匀,37℃水浴15 min后加入300 μ L显色液摇匀,每孔吸100 μ L液体至96孔板中,酶标仪测定吸光度值(波长为520 nm)。

1.3 统计学方法

运用SPSS 23.0统计软件进行分析,定量数据多

组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK检验,检验标准双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 表面微观形貌

SEM显示PT组试件表面光滑;AH组试件表面有纳米网状结构形成;PDA-HA组试件表面有大量纳米级羟基磷灰石颗粒黏附(图1)。

2.2 表面元素分析

EDS显示PT组试件表面有钛元素;AH组试件表面有钛、氧元素;PDA-HA组试件表面有钙、碳、

氧、钛元素(图2)。

2.3 体外细胞学评价

2.3.1 形态学评价

PT组细胞伪足少且伸展较局限,未呈现间充质干细胞的长梭状形态;AH试件表面细胞伸展呈长梭形,有伪足伸入网状结构内;PDA-HA组试件表面细胞伸展面积较AH面积大,且细胞胞体周围伸出的细小触角也较多(图3)。

2.3.2 CCK-8检测

细胞接种后,细胞增殖活性均有增长趋势。细胞接种后第4、7天,AH组、PDA-HA组细胞增殖活

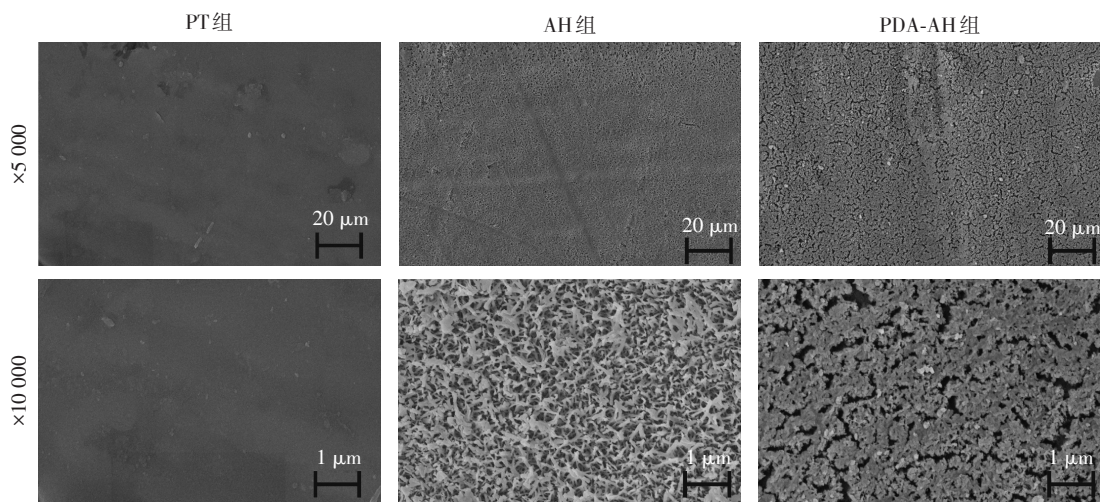


图1 3组样品表面SEM观察

Figure 1 Surface SEM observation of 3 groups of samples

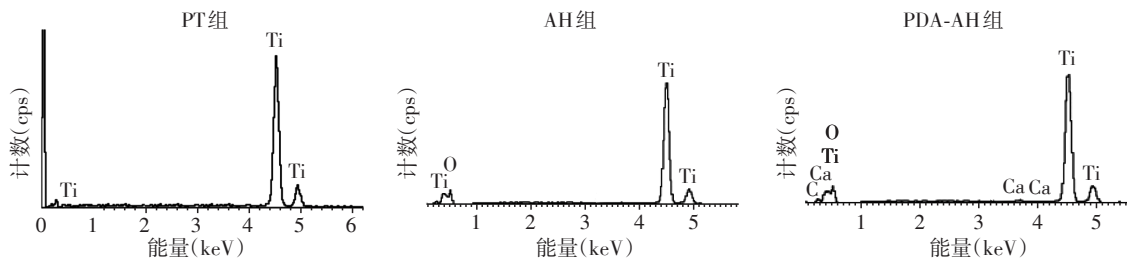


图2 3组试件表面能谱图

Figure 2 EDS of 3 groups of samples

性与PT组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PDA-HA组细胞增殖活性与PT组和AH组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

2.3.3 细胞ALP检测

细胞接种后,细胞ALP活性均有增加的趋势。细胞接种第4、7天,AH、PDA-HA组细胞ALP与PT相比差异有统计学意义($P < 0.05$),细胞接种第7天,PDA-HA组细胞ALP活性与PT组和AH组相比差异有统计学意义($P < 0.05$,图5)。

3 讨论

人们为了提高纯钛表面生物活性常常对其表面进行改性。表面改性可以分为两大类:化学/机械处理、生物活性涂层。

化学/机械处理目前在临床上应用广泛,通常用来改变钛种植体的表面微观形貌,研究认为表面微观形貌对细胞的早期黏附意义重大,一般来说达到1~10 μm的微观形貌尺寸成为微米级表面,达到1~

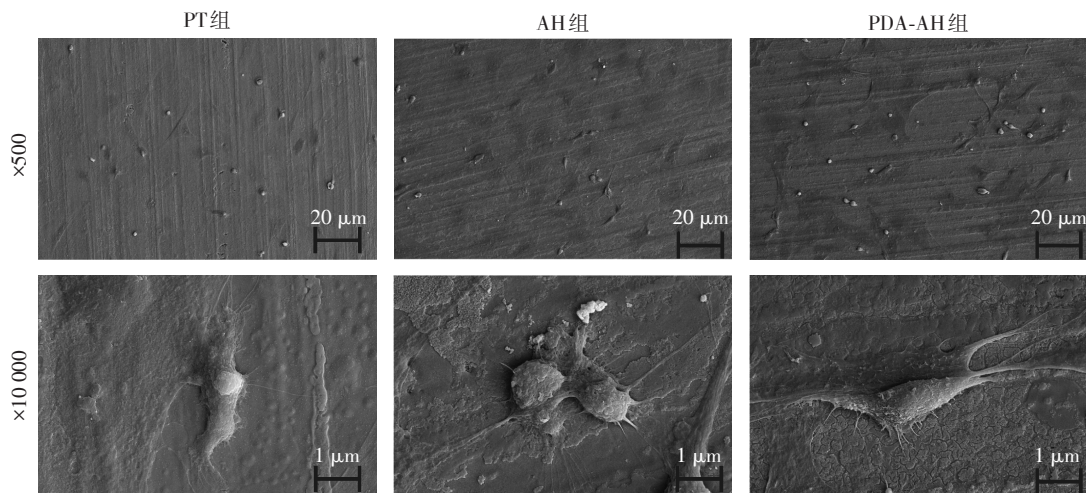


图3 3组样品表面细胞生长24 h后SEM观察

Figure 3 SEM observation of BMSCs adhesion on the 3 samples surfaces after 24 hours

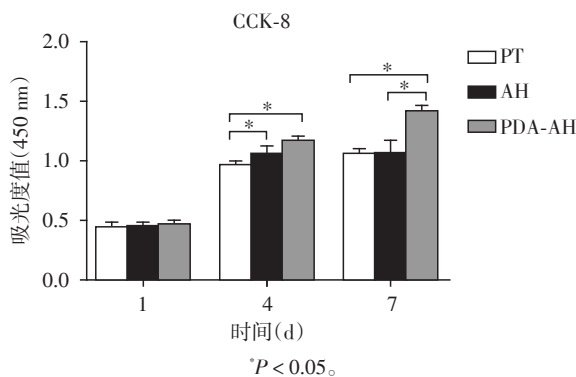


图4 不同时间3组试件细胞增殖情况的比较

Figure 4 Proliferation of BMSCs co-cultured with samples at different times

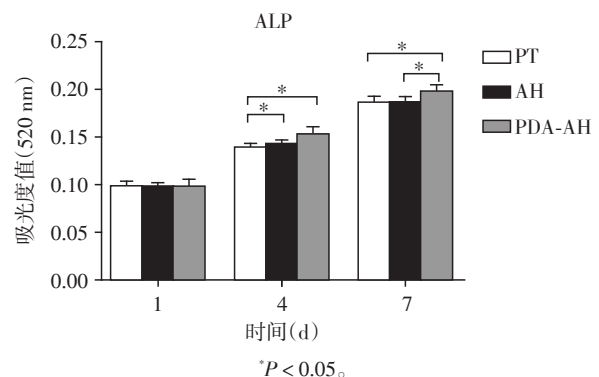


图5 不同时间3组试件细胞碱性磷酸酶活性的比较

Figure 5 ALP activity of BMSCs co-cultured with samples at different times

100 nm的微观形貌尺寸称为纳米级表面^[6]。常用的改性方法有:喷砂和酸蚀处理(sand-blasted large grit acid-etched, SLA)、阳极氧化、等离子喷涂和碱热处理等。SLA对于增强表面粗糙程度效果明显,但是目前的技术关于喷砂处理的可变因素较多,不易控制,处理后种植体表面无法做到精确满足需求,甚至可能出现降低其耐腐蚀性等情况。碱热处理是目前较常用的一种钛表面改性处理方式,该方法可以在纯钛表面形成一层厚约1 μm的无定型钛酸钠生物活性层,与单纯通过碱热处理获得的非晶态氧化膜相比,碱热处理获得的晶体化的氧化膜能成为磷灰石形成的稳定基体^[7]。碱热处理后的钛表面形成的钛酸钠层具有梯度结构,能使钛酸钠层与钛金属基紧密结合,骨和钛之间的结合会通过此薄的钛酸钠生物活性层完成。此层有足够的强度耐受负载,表面磷灰石形成能力和抗搔刮能力较单纯

碱处理也得到了显著改善,但是碱热处理后的钛表面要在模拟体液(simulated body fluid, SBF)中浸泡长达1周^[8],钛表面才会有HA形成,实验周期较长,可操作性稍差。

生物活性涂层是目前研究的热点,目前常用一些促进骨生长的分子或者细胞黏附分子来提高种植体骨结合能力^[9]。HA其化学结构与人体骨组织相似,具有良好的生物相容性和骨引导作用,能促进早期骨结合。目前,离子喷涂HA涂层在种植领域得到了广泛的运用并取得了一定的效果^[10],但是离子喷涂有成本高、涂层均匀以及易脱落等问题^[11]。近年来,聚多巴胺(PDA)因其对多种类型的基体(如金属、玻璃,有机物等)具有良好的黏附性,其结构含有大量的酚羟基和含氮基团可作为二级反应平台,具有良好的生物相容性等特点而被广泛应用于生物材料表面修饰。在有氧气的碱性条件下,多巴

胺中的邻酚羟基去质子化,氧化成为多巴胺醌式结构;多巴胺醌再经过环化、氧化作用和分子内重排生成5,6-二羟基吲哚;其进一步氧化、交联形成聚多巴胺,其结构类似于生物染色体黑色素,具有黏附作用^[12]。因此本实验对制备HA涂层进行了改进:通过碱热处理使得纯钛表面形成多孔隙结构,后再利用具有黏附性能和机械性能的聚多巴胺充当“生物胶水”,将HA颗粒黏附至碱热处理后的钛表面,使其形成一层致密的纳米级HA生物膜。在本实验中,多巴胺在溶液中自聚合,形成聚多巴胺纳米颗粒;其次当把经过碱热处理后的多孔钛片浸入到多巴胺反应溶液中时,聚多巴胺的纳米颗粒吸附在多孔钛表面,形成聚多巴胺单分子层;碱性条件下,溶液中的多巴胺不断在多孔钛表面聚合、沉积,形成聚多巴胺的低聚物。随着反应进行,聚多巴胺低聚物不断交联^[12]。与此同时,多孔钛表面羟基与聚多巴胺中的邻苯二酚基团发生脱水,相邻的邻苯二酚官能团与钛基底形成双齿类配位体得到聚多巴胺层;最后,将聚多巴胺修饰的多孔钛浸入到HA溶液中,使得HA黏附于其表面。从扫描电镜表面微观形貌来看,PT组表面较为光滑;AH组表面有大量纳米级网状结构形成,证明多孔钛支架已经形成;PDA-AH组表面网状支架已被纳米HA颗粒黏附,形成了纳米HA复合涂层。

骨结合是种植成功的关键,BMSCs作为成骨细胞的前体细胞,其在种植体表面早期黏附对于骨结合形成起着至关重要的作用^[13]。CCK-8实验进一步分析了各种表面对BMSCs增殖的影响。AH组和PDA-HA组在1~7 d内表现出良好的增殖优势,均优于PT组。从形态学上来看,AH组和PDA-HA组表面细胞黏附效果均优于PT组,PDA-HA组细胞黏附和伸展更具优势。碱性磷酸酶实验表明,改性后的两组均有利于早期成骨分化,而PDA-HA组早期成骨分化效果更好。

本实验通过碱热处理在表面构建纳米级网状结构,利用聚多巴胺的黏附作用将纳米级HA颗粒黏附至碱热处理后的纳米级网状多孔钛表面,形成纳米级HA生物膜。实验结果表面碱热处理后的纳米级网状结构有利于细胞的黏附和伸展,而纳米级HA涂层能进一步促进BMSCs的增殖和分化。对于种植体表面改性有着一定的指导意义。

[参考文献]

[1] Amin YS, Van DSJ, Chai YC, et al. Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium[J]. *Biomate-*

rials, 2014, 35(24):6172-6181

- [2] Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions [J]. *Periodontology*, 2017, 73(1):22
- [3] Xu M, Zhang Y, Zhai D, et al. Mussel-inspired bioactive ceramics with improved bioactivity, cell proliferation, differentiation and bone-related gene expression of MC3T3 cells[J]. *Biomaterials*, 2013, 1(9):933-941
- [4] Kang DH, Jung HS, Kim K, et al. Mussel-inspired universal bioconjugation of polydiacetylene liposome for droplet-array biosensors [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(48):42210
- [5] Sugiura F, Kitoh H, Ishiguro N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(1):233-239
- [6] Davies JE, Mendes VC, Ko JC, et al. Topographic scale-range synergy at the functional bone/implant interface [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1):25-35
- [7] Kokubo T, Yamaguchi S. Suppl 1-M2: Bioactive titanate layers formed on titanium and its alloys by simple chemical and heat treatments [J]. *Open Biomedical Engineering Journal*, 2015, 9(Suppl 1-M2):29-41
- [8] Pittrof A, Bauer S, Schmuki P. Micropatterned TiO₂ nanotube surfaces for site-selective nucleation of hydroxyapatite from simulated body fluid [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(1):424-431
- [9] Salou L, Hoornaert A, Louarn G, et al. Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: An experimental study in rabbits [J]. *Acta Biomater*, 2015, 11:494-502
- [10] Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Induction plasma sprayed nano hydroxyapatite coatings on titanium for orthopaedic and dental implants [J]. *Surface & Coatings Technology*, 2011, 205(8-9):2785
- [11] Rajesh P, Muraleedharan CV, Sureshbabu S, et al. Preparation and analysis of chemically gradient functional bioceramic coating formed by pulsed laser deposition [J]. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2012, 23(2):339-348
- [12] Zhang RX, Braeken L, Luis P, et al. Novel binding procedure of TiO₂ nanoparticles to thin film composite membranes via self-polymerized polydopamine [J]. *Journal of Membrane Science*, 2013, 437(12):179-188
- [13] Maino BG, Di BA, Spadoni D, et al. The integration of orthodontic miniscrews under mechanical loading: a pre-clinical study in rabbit [J]. *European Journal of Orthodontics*, 2017, 39(5):519-527

[收稿日期] 2017-12-27