

· 基础研究 ·

亲水末端硅烷接枝促进氧化锆表面骨结合的初步证据

洪高英^{1,2,3}, 陈 晨^{2,3,4}, 谢海峰^{1,2,3*}

¹南京医科大学附属口腔医院口腔修复科, 江苏 南京 210029; ²江苏省口腔疾病研究重点实验室, 江苏 南京 210029; ³江苏省口腔转化医学工程研究中心, 江苏 南京 210029; ⁴南京医科大学附属口腔医院口腔牙体牙髓科, 江苏 南京 210029

[摘 要] 目的: 观察接枝不同末端硅烷的氧化锆材料对 MC3T3-E1 小鼠前成骨细胞黏附、增殖和分化的影响。方法: 通过共价结合的方式在氧化锆表面接枝不同末端基团的硅烷, X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析检测各组氧化锆表面的理化表征, 通过激光共聚焦显微镜观察 MC3T3-E1 细胞在 24 h 时的黏附及形态, 在培养 1、3、5 d 后通过 CCK-8 法评价各组细胞增殖水平, 使用碱性磷酸酶试剂盒检测成骨细胞培养 7、14 d 后的分化情况。结果: XPS 结果显示 4 种不同末端硅烷均成功接枝到氧化锆表面; SEM、XRD 结果提示碱热及硅烷处理不破坏氧化锆表面完整性及晶相结构; MC3T3-E1 细胞在接枝亲水的氨基、巯基末端硅烷的氧化锆表面黏附情况好, 增殖活性高, 且碱性磷酸酶的表达较未处理组高, 而疏水末端甲基、乙烯基末端硅烷对细胞增殖无明显影响, 对细胞分化起抑制作用。结论: 接枝亲水末端硅烷的氧化锆表面对小鼠成骨细胞的黏附、增殖和分化均有促进作用。

[关键词] 硅烷; 氧化锆种植体; 表面改性; 骨结合

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)11-1579-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20211103

The surface of zirconia grafted with hydrophilic end silanes promotes osteogenesis

HONG Gaoying^{1,2,3}, CHEN Chen^{2,3,4}, XIE Haifeng^{1,2,3*}

¹Department of Prosthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Jiangsu Province Key Laboratory of Oral Diseases, Nanjing 210029; ³Jiangsu Province Engineering Research of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029; ⁴Department of Endodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the influence of silanes with different end groups grafting on the zirconia surface on the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast. **Methods:** A self-assembled monolayer was formed on the surface of zirconia by covalent bonding. After hydroxylation, zirconia surface was grafted with different terminal groups of silanes, and then mouse preosteoblasts are cultured on the surface. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscope (SEM) and X-ray diffraction (XRD) analysis were used to detect the physical and chemical characteristics of the zirconia surface. The adhesion and morphology of MC3T3-E1 cells were observed by laser confocal microscope after 24 h culture. After 1, 3 and 5 days, the cell proliferation level of each group was evaluated by the CCK-8 assay, and the differentiation of osteoblasts after 7 and 14 days of culture was detected by the alkaline phosphatase kit. **Results:** XPS results showed that the four different terminal silanes were successfully grafted to the zirconia surface. SEM and XRD results indicated that alkali heat and silane treatment had no obvious impact on the topography and crystal phase of zirconia surface. Zirconia grafted with hydrophilic terminal amino- and mercapto- silanes, presented excellent adhesion and high proliferation activity, and the expression of alkaline phosphatase is higher than that of the untreated group, while the hydrophobic methyl- and vinyl- silanes has no obvious effect on cell proliferation, and inhibit cell differentiation. **Conclusion:** Zirconia modified with hydrophilic end groups (such as mercapto and amino) of silanes can promote cell adhesion, proliferation and differentiation.

[Key words] silane; zirconia implant; surface modification; osteogenesis

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(11): 1579-1584]

[基金项目] 国家自然科学基金(81970927); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2018-87); 江苏省卫生健康委医学科研项目(M2020066)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xhf-1980@126.com

氧化锆陶瓷是当前备受关注的牙科种植体候选材料之一,但由于生物惰性,难以实现良好的骨结合^[1-2]。在氧化锆表面制备生物活性涂层是目前改善氧化锆表面生物活性的主要方式之一,但远期涂层降解、剥脱等问题无法避免^[3-5]。因此,化学改性是一种更可靠的方式。

硅烷是最常见的一类能够与金属氧化物结合的功能性化合物,其在牙科通常应用在底涂剂、粘接剂以及复合树脂中^[6-7]。硅烷能够克服氧化锆表面化学稳定性,与其表面羟基共价缩合形成Zr-O-Si键^[8-9]。

此外,亲水的氨基、酸酐末端的硅烷已被证实修饰氧化石墨烯、钛、氧化锆等材料表面具有提高生物相容性和促进成骨的作用^[10-12]。本研究的目的是比较接枝不同亲疏水末端基团硅烷的氧化锆表面对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1生物学行为的影响,为促进氧化锆种植体早期骨结合提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠前成骨细胞系MC3T3-E1(中科院上海细胞库), α -MEM培养液、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司,美国)、PBS缓冲液(Hyclone公司,美国)、鬼笔环肽、DAPI(Apexbio公司,美国)、CCK-8试剂盒(Dojindo公司,日本)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(南京建成生物工程研究所),3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(γ -MPS)、甲基三甲氧基硅烷(MTMS)、3-巯丙基三甲氧基硅烷(MPTS)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)(上海阿拉丁公司),酶标定量测试仪(Waltham公司,美国)、激光共聚焦显微镜(LSM 780, Carl Zeiss AG公司,德国)、X射线能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)仪(Escalab 250xi, Thermo Fisher Scientific公司,美国)、X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)仪(D8 ADVANCE, Bruker AXS公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 试件的制备及分组

切割直径分别为5、13 mm,厚度为1 mm的氧化锆圆片,所有样本在使用前分别经400、600、800、1 200目的碳化硅纸抛光至镜面。

实验分6组($n=6$),分别为未处理组(NT组)、碱处理组(HT组)、 γ -MPS处理组(HT-MPS组)、MTMS处理组(HT-MTMS组)、MPTS处理组(HT-MPTS

组)、APTES处理组(HT-APTES组)。氧化锆圆片先在浓度5 mol/L的氢氧化钠溶液中60℃下过夜浸泡,然后分别用 γ -MPS(乙烯基末端)、MTMS(甲基末端)、MPTS(巯基末端)、APTES(氨基末端)硅烷溶液处理24 h。所有硅烷溶液的浓度为2%,溶剂为无水乙醇。硅烷化的样本分别经无水乙醇、双蒸水超声清洗10 min,去除表面未反应的多余硅烷,65℃烘箱干燥。

1.2.2 XPS分析

通过XPS分析评估表面化学成分及硅烷化情况。在225 W下用单色AlK α 辐照(1 486.7 eV)进行测量,入射角为90°。使用XPS Peak 4.1软件对O1s谱进行分峰处理,用C1(285.0 eV)校准每个光谱的结合能。

1.2.3 扫描电子显微镜观察

各组氧化锆样本镀金后,使用扫描电子显微镜在背散射电子模式观察表面形貌,加速电压为15 kV。

1.2.4 XRD分析

通过XRD在掠入射模式下测定氧化锆圆片在硅烷化前后的晶相变化。扫描范围为20°~80°,扫描速度为0.02°/min。

1.2.5 免疫荧光观察细胞黏附及形态

将各组消毒灭菌后直径为5 mm的氧化锆圆片置于96孔板,MC3T3-E1细胞接种密度为3 000个/孔,每个组分别设置3个平行对照组。细胞培养24 h后,用PBS漂洗2遍后,使用4%的多聚甲醛溶液固定10 min, PBS漂洗细胞2遍,每孔加入1 mL 0.1% Triton-X 100通透液,然后用稀释过的罗丹明-鬼笔环肽染色40 min后用PBS漂洗。每孔加入100 μ L稀释过的DAPI染色剂(稀释比例按说明书进行),进行细胞核的染色,染色时间为2 min。将荧光淬灭剂滴到盖玻片上,在激光共聚焦显微镜下进行荧光观察并拍照。

1.2.6 CCK-8法检测细胞增殖

使用CCK-8法测定1、3、5 d的细胞数。将各组消毒灭菌后的直径为5 mm的氧化锆圆片置于96孔板,MC3T3-E1细胞接种密度为3 000个/孔,每个组分别设置3个平行对照组。培养到设定时间点后,吸去培养基, PBS冲洗两遍,向每孔加入100 μ L培养基和10 μ L CCK-8液培养2 h。使用酶标定量测试仪测定在450 nm处的吸光度。

1.2.7 ALP活性测定

ALP是检测细胞早期成骨分化的重要指标之一。将各组消毒灭菌后的直径为13 mm的氧化锆

圆片置于24孔板,MC3T3-E1细胞的接种密度为 1×10^4 个/孔,每个组分别设置3个平行对照组。培养到设定时间点后,吸去培养基,PBS冲洗两遍,加入0.1% Triton X-100 500 μ L,经振荡后按照ALP测定试剂盒说明进行操作,酶标仪560 nm处测定吸光度值。BCA试剂盒测量蛋白总浓度并进行标准化。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对材料表面细胞增殖实验以及ALP活性实验数据进行统计分析,各组数据满足正态分布和方差齐性,对各组数据进行单因素方差分析,并用LSD法进行多重比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 XPS结果

表1为各组氧化锆试件表面的原子百分比。经碱热处理后试件表面的C含量减少,O含量增加。经过硅烷改性的HT-MPS、HT-MTMS、HT-MPTS、HT-APTES相较NT组和HT组Si含量明显提高,分别为9.57%、11.48%、9.18%和8.23%。此外,巯基硅烷改性的表面检测到4.17% S元素,氨基硅烷改性的氧化锆表面检测到3.27% N元素。

XPS总谱(图1)结果显示,HT-MPS、HT-MTMS、HT-MPTS、HT-APTES组在346 eV附近的Zr3p1峰,332 eV附近的Zr3p2峰,180 eV附近的Zr3d峰分别出现下降,在102 eV附近出现Si峰。

2.2 SEM结果

图2为各组氧化锆表面形态观察结果,可见碱热及硅烷处理并未造成氧化锆表面腐蚀空隙,表面形貌未发生明显改变。

表1 各组氧化锆表面元素百分比
Table 1 Quantification of the zirconia surfaces in each group (%)

组别	C	O	Si	Zr	N	S
NT组	41.75	44.09	1.17	12.99	0	0
HT组	38.00	45.55	1.10	15.35	0	0
HT-MPS组	55.05	32.42	9.57	1.72	1.25	0
HT-MTMS组	31.71	48.28	11.48	6.91	1.62	0
HT-MPTS组	34.33	44.57	9.18	6.60	1.14	4.17
HT-APTES组	34.28	46.27	8.23	7.95	3.27	0

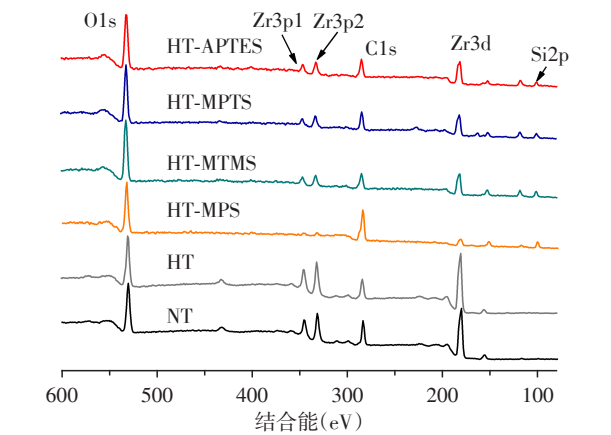


图1 氧化锆试表面硅烷化前后的X射线光电子能谱结果
Figure 1 X-Ray photoelectron spectrum of zirconia surface before and after silanization

2.3 XRD结果

图3的XRD结果显示,在 29.6° 、 34.6° 、 49.8° 、 59.3° 附近观察到氧化锆四方相的特征峰^[13],且各组氧化锆表面晶相未发生明显改变。

2.4 细胞黏附及形态观察

MC3T3-E1细胞在氧化锆表面培养24 h后进行

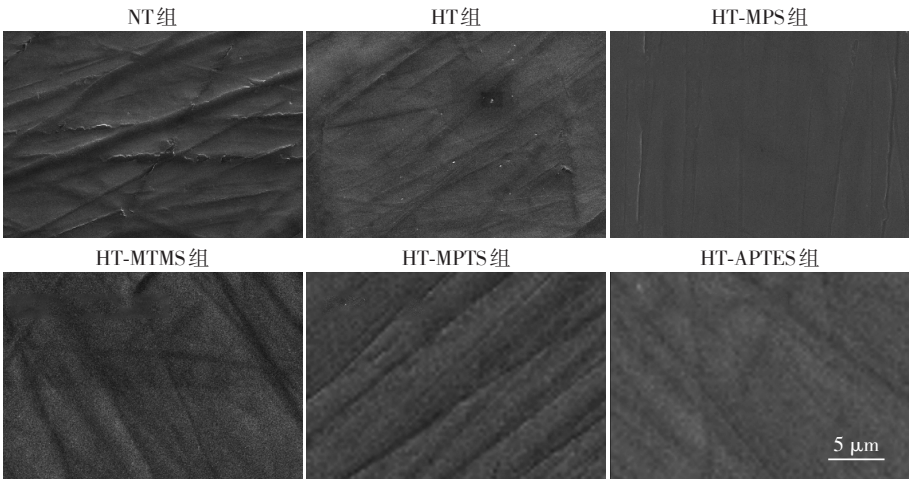


图2 氧化锆改性前后表面形态观察结果($\times 10\,000$)

Figure 2 Scanning electron microscope observation of zirconia surface before and after modification ($\times 10\,000$)

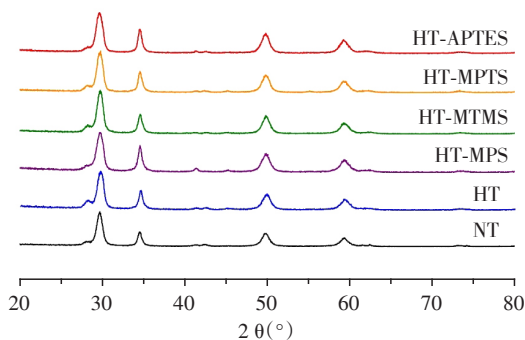


图3 氧化锆表面硅烷化前后的X射线衍射结果

Figure 3 X-ray diffraction patterns of zirconia surface before and after silanization

染色,通过激光共聚焦显微镜对细胞黏附及形态进行观察(图4)。24 h免疫荧光染色显示,HT-MPS组、HT-MTMS组氧化锆表面细胞密度明显低于NT组、HT组、HT-MPTS组、HT-APTES组。HT组、HT-MPTS组、HT-APTES组表面的细胞呈良好的扩散和多边形形态,细胞间可见微丝形成的细胞骨架交通互相联络,而NT组细胞呈平铺状态黏附于氧化锆表面,HT-MPS组、HT-MTMS组细胞则存在折叠、未铺展的情况。

2.5 细胞增殖活性检测

图5为MC3T3-E1细胞在各组不同的氧化锆样

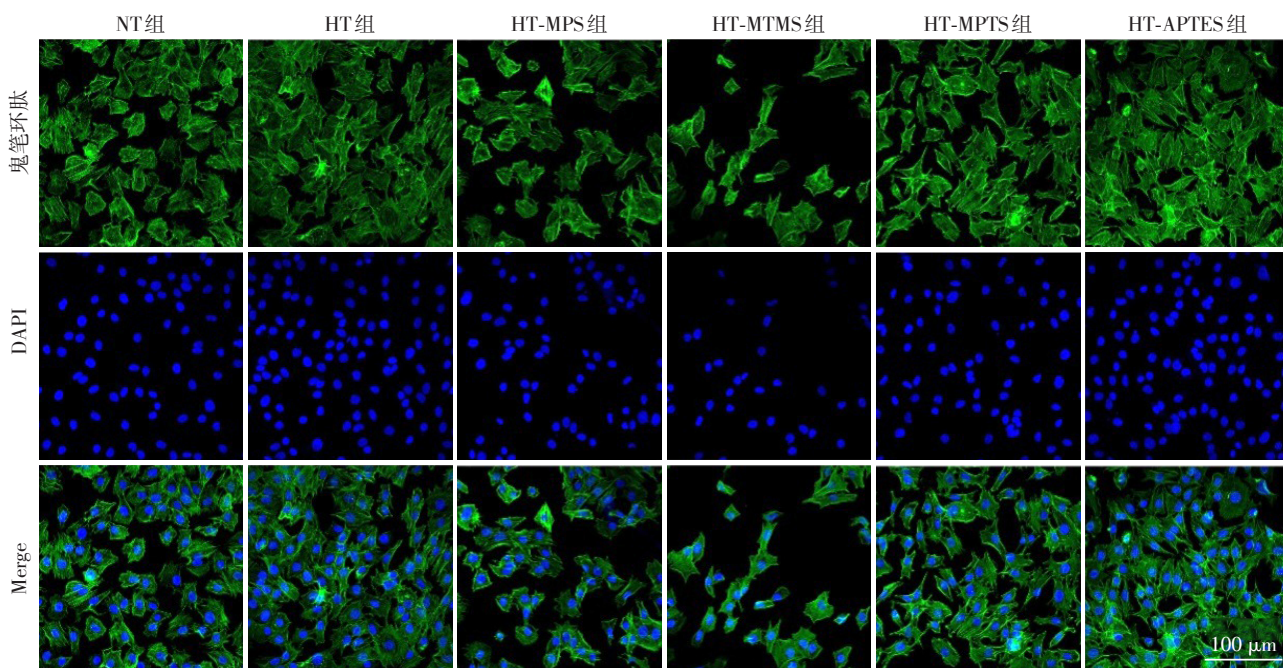


图4 MC3T3-E1细胞在各组氧化锆表面培养24 h后的免疫荧光图像

Figure 4 Immunofluorescence staining of MC3T3-E1 cells at 24 h after seeding on zirconia surface

本表面培养1、3、5 d后的细胞增殖情况。当培养到第5天时,HT-MPTS、HT-APTES组的细胞增殖情况好于NT组,而HT-MPS、HT-MTMS组与NT组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 ALP活性检测

图6显示了各组氧化锆样本表面MC3T3-E1细胞在成骨诱导培养7、14 d后ALP的相对表达情况。在第7天时,HT-APTES组的ALP表达提高,与NT组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。当培养14 d后,HT-MTMS组、HT-MPTS组和HT-APTES组ALP表达与NT组差异有统计学意义($P < 0.05$),其中HT-MPTS组、HT-APTES组ALP呈高表达,而HT-MTMS组ALP的表达出现明显下降。

3 讨论

早期骨结合是影响种植成功的关键因素,而促进种植体周围良好的细胞生物学行为和骨结合在于材料表面形貌及其化学组成^[14-15]。传统的氧化锆表面处理通过喷砂、酸蚀等方式改变表面形貌增加粗糙度,但其会破坏氧化锆表面完整性,产生微裂纹,进而影响机械性能^[16]。通过共价结合方式长效稳定地改变氧化锆表面化学结构,无疑是一条理想途径。课题组以往研究已经证实硅烷通过其一端的烷氧基水解为硅醇后,与氧化锆表面的羟基共价缩合形成Zr-O-Si键,且硅烷另一端的有机官能团将影响硅烷水解为硅醇的效率,进而影响硅烷与氧化

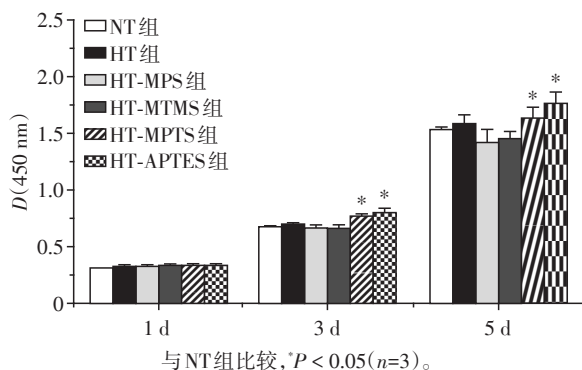


图5 MC3T3-E1细胞增殖情况

Figure 5 Proliferation of MC3T3-E1 cells

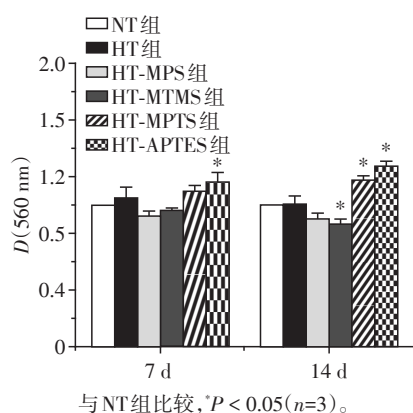


图6 MC3T3-E1细胞ALP表达情况

Figure 6 ALP protein expression of MC3T3-E1 cells

锆之间的化学亲和性^[8]。

由于氧化锆呈化学惰性,表面羟基含量较少,以往研究证实通过紫外线、氧等离子体喷涂、碱化处理等方式均能够提高氧化锆表面的羟基密度^[17-18]。因此本研究预先采取碱化处理以提高氧化锆表面的羟基密度,进而接枝硅烷提高硅烷与氧化锆间的结合效率。X射线光电子能谱结果显示氧化锆表面经碱热处理后,其表面的C元素下降,O元素含量提高,一定程度上说明碱热处理有效提高了氧化锆表面的羟基含量。从图1可见各硅烷改性组在346 eV附近的Zr3p₁峰、332 eV附近的Zr3p₂峰、180 eV附近的Zr3d峰分别出现下降,而在102 eV附近出现Si峰,且HT-MPS组、HT-MTMS组、HT-MPTS组、HT-APTES组氧化锆表面Si元素原子百分比分别提高至9.57%、11.48%、9.18%、8.23%,说明硅烷有效接枝到氧化锆表面。在NT组及HT组氧化锆样本表面同样检测出了少量的Si元素,这或许是因为在用碳化硅纸进行抛光处理时,C、Si元素残留在样本表面。

此外,X射线衍射结果证实碱热及硅烷处理均

不会破坏氧化锆表面结构的完整性以及晶相的构成,说明该处理方式不存在远期影响氧化锆种植体机械性能的风险。此外,以往文献报道具有四方相占比高的光滑氧化锆表面能够促进MG-63的细胞生物学行为^[19]。

材料表面的亲疏水性很大程度上影响细胞的黏附性为,通常认为亲水性表面有利于细胞黏附^[20]。免疫荧光图像显示,在HT、HT-MPTS、HT-APTES表面的细胞呈良好的扩散和多边形形态,细胞间可见微丝形成的细胞骨架交通互相联络,而NT组细胞呈平铺状态黏附于氧化锆表面,HT-MPS组、HT-MTMS组细胞则存在折叠、未铺展的情况,并且HT-MPS、HT-MTMS氧化锆表面细胞密度明显低于NT组、HT组、HT-MPTS组、HT-APTES组,说明不同末端基团硅烷改性的氧化锆表面影响细胞的早期黏附,其中亲水氨基、巯基末端改性的氧化锆表面对MC3T3-E1细胞的黏附有一定促进作用。这可能是由于亲水末端硅烷接枝的氧化锆表面亲水性增加,而甲基、乙烯基末端硅烷接枝的氧化锆表面更加疏水。而HT对表面细胞同样呈现有利的黏附作用,因为碱化处理可使材料表面亲水性增加。细胞增殖实验提示当细胞培养到第3天和第5天时,HT-MPTS组、HT-APTES组的吸光度值明显提高,说明亲水氨基、巯基末端硅烷能够促进MC3T3-E1细胞增殖。结合以往研究酸酐末端改性的钛表面能够促进Sao-2细胞增殖^[12],氨基末端硅烷改性的氧化石墨烯表面能够促进人成纤维细胞HADF、小鼠胚胎成纤维细胞NIH-3T3、MG-63等多种细胞的增殖^[10],或许可以认为促进细胞增殖是亲水末端硅烷的共性,而非局限于特定的末端硅烷。MC3T3-E1细胞的早期分化可以通过检测ALP的表达来评价。根据对各组细胞培养7、14 d后的ALP定量检测情况,HT-MPTS和HT-APTES组吸光度值提高,而HT-MPS组和HT-MTMS组吸光度值下降,说明亲水氨基、巯基末端硅烷能够促进MC3T3-E1细胞分化,疏水甲基、乙烯基末端硅烷抑制其分化,亲水末端硅烷促进MC3T3-E1细胞分化的具体机制有待进一步研究。

本研究观察比较了4种不同亲疏水末端硅烷改性的氧化锆表面对MC3T3-E1细胞黏附、增殖和分化的影响。以上实验结果认为亲水末端硅烷应用于氧化锆种植体表面能够促进早期骨结合。此外,硅烷作为偶联剂不仅单独提供活性,其末端的有机官能团能够与有机物结合,提供一个结合其他活性成分的平台,潜在地拓宽了氧化锆表面改性的策略,为

推进氧化锆种植体的临床应用提供了基础。

[参考文献]

- [1] SAITO M M, ONUMA K, YAMAMOTO R, et al. New insights into bioactivity of ceria-stabilized zirconia: direct bonding to bone-like hydroxyapatite at nanoscale[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 121: 111665
- [2] 于婉琦, 周延民, 赵静辉. 口腔种植体新材料的研究现状[J]. *国际口腔医学杂志*, 2019, 46(4): 488-496
- [3] 李 静, 姜采弟, 叶 晖, 等. 氧化锆种植体表面处理技术研究进展[J]. *中华口腔医学杂志*, 2020, 14(9): 691-695
- [4] SCHÜNEMANN F H, GALÁRRAGA-VINUEZA M E, MAGINI R, et al. Zirconia surface modifications for implant dentistry [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 98: 1294-1305
- [5] GRAZIANI G, BARBARO K, FADEEVA I V, et al. Ionized jet deposition of antimicrobial and stem cell friendly silver-substituted tricalcium phosphate nanocoatings on titanium alloy[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(8): 2629-2642
- [6] 江 楠, 王 楠, 张懿范, 等. 氧化锆粘接处理剂的临床应用与前景[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(10): 1635-1640
- [7] MATINLINNA J P, LUNG C Y K, TSOI J K H. Silane adhesion mechanism in dental applications and surface treatments: a review[J]. *Dent Mater*, 2018, 34(1): 13-28
- [8] YANG J, LIAO M, HONG G, et al. Effect of APTES- or MPTS - conditioned nanozirconia fillers on mechanical properties of bis-GMA-based resin composites [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(50): 32540-32550
- [9] ZIDAN S, SILIKAS N, AL-NASRAWI S, et al. Chemical characterisation of silanised zirconia nanoparticles and their effects on the properties of PMMA-Zirconia nanocomposites[J]. *Materials (Basel)*, 2021, 14(12): 3212
- [10] VUPPALADADIUM S S R, AGARWAL T, KULANTHAIVEL S, et al. Silanization improves biocompatibility of graphene oxide[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 110: 110647
- [11] CARAVACA C, SHI L, BALVAY S, et al. Direct silanization of zirconia for increased biointegration [J]. *Acta Biomater*, 2016, 46: 323-335
- [12] GODOY-GALLARDO M, GUILLEM-MARTI J, SEVILLA P, et al. Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblast cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 59: 524-532
- [13] SHEN J D, XIE H F, WU X Y, et al. Evaluation of the effect of low-temperature degradation on the translucency and mechanical properties of ultra-transparent 5Y-TZP ceramics[J]. *Ceramics Intern*, 2020, 46: 553-559
- [14] 尤 莹, 卜寿山, 庄 海, 等. 钛表面碱热处理构建聚多巴胺膜层对细胞黏附的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(6): 833-837
- [15] 周 晓, 邵水易, 明盼盼, 等. 双酸酸蚀钛表面复合含钙纳米薄片膜层对成骨细胞行为的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(10): 1251-1256
- [16] JAKOVAC M, KLASER T, RADATOVIĆ B, et al. Impact of sandblasting on morphology, structure and conductivity of zirconia dental ceramics material [J]. *Materials (Basel)*, 2021, 14(11): 2834
- [17] SHEHZAD K, AHMAD M, HE J, et al. Synthesis of ultra-large ZrO₂ nanosheets as novel adsorbents for fast and efficient removal of As(Ⅲ) from aqueous solutions [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 533: 588-597
- [18] HAN A, TSOI J K H, MATINLINNA J P, et al. Effects of different sterilization methods on surface characteristics and biofilm formation on zirconia *in vitro* [J]. *Dent Mater*, 2018, 34(2): 272-281
- [19] ROHR N, BERGEMANN C, NEBE J B, et al. Crystal structure of zirconia affects osteoblast behavior [J]. *Dent Mater*, 2020, 36(7): 905-913
- [20] DE DEUS W F, DE FRANÇA B M, FORERO J S B, et al. Curcuminoid-tailored interfacial free energy of hydrophobic fibers for enhanced biological properties [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(21): 24493-24504

[收稿日期] 2021-07-16