

## 纯钛表面二氧化钛纳米管对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化的影响

丁思阳, 陈 宁, 沈 铭\*

(南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学附属口腔医院种植修复科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 探讨纯钛表面二氧化钛(TiO<sub>2</sub>)纳米管改性后对人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)增殖、成骨分化能力的影响。评价TiO<sub>2</sub>纳米管改性作为种植体表面改性方法的作用。**方法:** 将实验组钛片进行阳极氧化TiO<sub>2</sub>纳米管处理, 对照组仅进行抛光处理。将hPDLSCs与两组钛材分别复合培养, 检测其增殖及成骨相关蛋白的表达水平。**结果:** 成功在钛材表面制备了多孔、有序、管径约为100 nm的TiO<sub>2</sub>纳米管; 实验组hPDLSCs较对照组1 d的增殖活性及4 d的ALP活性没有明显差异; 而4、7 d实验组细胞的增殖活性低于对照组; 而7 d、14 d及21 d实验组细胞ALP活性高于对照组; 21 d时, 实验组Col-I、OCN、Runx-2的基因表达水平明显高于对照组。**结论:** 通过阳极氧化可在钛材表面制备多孔有序的TiO<sub>2</sub>纳米管层; 且TiO<sub>2</sub>纳米管能有效促进hPDLSCs在钛表面的骨向分化。

**[关键词]** 纳米管; 钛材; 人牙周膜干细胞; 成骨分化

**[中图分类号]** R329.28

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)12-1426-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20161204

## Effect of titanium modified by anodic oxidized TiO<sub>2</sub> nanotubes on human periodontal ligament stem cells

Ding Siyang, Chen Ning, Shen Ming\*

(Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Dental Implant, Affiliated Hospital of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of titanium modified by anodic oxidized TiO<sub>2</sub> nanotubes on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells(hPDLSCs). **Methods:** TiO<sub>2</sub> nanotubes group and control group(smooth titanium) were involved in this study. The cell proliferation was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The osteogenic differentiation was evaluated using alkaline phosphatase (ALP) activity assay. In addition, osteogenic marker genes expression including Col-I, OCN and Runx-2 was evaluated. **Results:** We prepared nominally TiO<sub>2</sub> nanotubes with 100 nm diameter on Ti substrates by anodization. No significant difference was detected on the proliferative activity at day 1 and the ALP activity at day 4 between the TiO<sub>2</sub> nanotubes group and control group ( $P > 0.05$ ). However, cell proliferative activity of TiO<sub>2</sub> nanotubes group was lower than that of the control group at day 4 and 7. ALP activity assay demonstrated that the TiO<sub>2</sub> nanotubes group at day 7, 14 and 21 had a high ALP activity. The gene expression of Col-I, OCN, and Runx-2 of TiO<sub>2</sub> nanotubes group was up-regulated at 21-days. **Conclusion:** The proliferation activity of hPDLSCs on the TiO<sub>2</sub> nanotubes was less than that of control group. ALP activity, gene expression TiO<sub>2</sub> nanotubes group were higher than those of on control group, and it suggested that TiO<sub>2</sub> nanotubes could promote osteogenic differentiation of hPDLSCs.

**[Key words]** nanotubes; pure titanium; hPDLSCs; osteogenic differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(12): 1426-1430]

钛(Ti)由于良好的生物相容性, 目前已被广泛

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81271109); 江苏省高校优势学科工程(2014-37)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: mingshen85@yahoo.com

用于牙科种植系统, 其表面特性是其与骨组织结合的关键因素之一。国内外学者越来越关注钛表面改性处理, 其中钛表面如何影响种植体周围组织的生物反应, 以及骨组织是如何适应并理想地与钛表面形成骨结合成为种植领域的研究热点之一<sup>[1]</sup>。

阳极氧化法制备二氧化钛(TiO<sub>2</sub>)纳米管是一种新型纳米材料,其通过形成有序性表面,可以提高钛材表面积和空隙率,并表现出独特的物理和化学性质<sup>[2]</sup>,进而形成良好的种植体骨结合。此外,种植体周围的成骨细胞甚至与成骨相关的其他细胞对于形成良好的骨结合也至关重要。人牙周膜干细胞(hPDLSCs)是一种分离自牙周膜的具有多能干细胞特性的成体干细胞<sup>[3]</sup>,目前已有研究证实分离纯化的hPDLSCs具有成骨、成脂和成神经分化的能力<sup>[3-5]</sup>。hPDLSCs成骨向的分化对种植体周围骨结合的形成有着十分重要的意义。本实验旨在利用阳极氧化法对纯钛表面改性,体外观察TiO<sub>2</sub>纳米管对hPDLSCs的早期增殖、ALP活性及其成骨相关基因表达的影响,评价TiO<sub>2</sub>纳米管改性作为种植体表面改性方法的作用和意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

圆形纯钛片(等级:GB TA2,直径10 mm,厚度1 mm,宝鸡有色金属加工厂), $\alpha$ -MEM培养液、胎牛血清(Wisent公司,加拿大),I型胶原酶、Dispase酶(Gibco公司,美国), $\beta$ -甘油磷酸钠,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,Sigma公司,美国),ALP测定试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司),RNA逆转试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>定量PCR酶混合物试剂盒(TaKaRa公司,日本),I型胶原(Col-I)抗体、核心结合蛋白因子2(RUNX2)抗体、骨钙素(OCN)抗体(Santa Cruz公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试样制备及实验分组

本实验分为实验组和对照组两组,每组各20个钛片。将直径为10 mm,厚度为1 mm的圆形钛片表面用碳化硅砂纸,按照400#,600#,800#至1200#的号顺序依次磨平、抛光。所有试样依次采用无水乙醇、去离子水超声清洗15 min后,干燥备用。实验组以钛试件为阳极,石墨棒为阴极,在20 V的电压下,置于含0.4 mol/L氢氟酸和1.0 mol/L磷酸的电解液溶液中,阳极氧化1 h。反应结束后,立即使用去离子水清洗、干燥,于450℃加热退火3 h。单纯抛光后的钛片作为实验的对照组。所用的试件高温高压消毒后备用。

#### 1.2.2 扫描电镜观察(SEM)

试件采用JSM-7000F扫描电子显微镜观察试

件表面形态。工作电压5.0 kV。

#### 1.2.3 hPDLSCs的培养

根据Seo等<sup>[3]</sup>报道的方法分离hPDLSCs。取12~24岁之间因正畸或阻生智齿而拔除的、牙体牙周均健康的新鲜恒牙收集细胞,调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^4$ 个/mL,转移于3 mL含10%胎牛血清,1%双抗(青/链霉素)的培养基中。2~3 d更换培养液,待细胞融合至80%时进行传代。当细胞传代至第4至第7代,以 $1.5 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>的细胞密度接种于钛片上,用于实验检测。检测成骨分化时,hPDLSCs细胞接种于钛片7d时培养基更换为含有10%胎牛血清、100 nmol/L地塞米松、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠和50  $\mu$ g/mL维生素C的 $\alpha$ -DMEM诱导分化培养基。

#### 1.2.4 成骨细胞增殖检测

hPDLSCs细胞接种后第1、4及7 d后终止细胞培养,PBS漂洗2遍,每孔加入5 g/L MTT 200  $\mu$ L和800  $\mu$ L无血清DMEM,37℃孵育4 h后小心吸弃上清,每孔加入1 mL DMSO,低速震动溶解生成的结晶物。每孔取3份200  $\mu$ L溶解液转移入96孔培养板,在490 nm波长下用酶标仪测吸光度值。

#### 1.2.5 hPDLSCs细胞ALP活性检测

hPDLSCs细胞接种第4、7、14和21 d后,终止细胞培养,吸弃培养液,PBS漂洗3遍。每孔加入2 mL/L Triton X-100 250  $\mu$ L,4℃放置过夜。每孔加入ALP底物500  $\mu$ L,37℃孵育0.5 h。每孔加入0.2 mol/L NaOH 250  $\mu$ L终止反应。在410 nm波长下用分光光度计测吸光度值,并用细胞总蛋白合成标准化,检测其ALP活性。

#### 1.2.6 成骨相关功能基因的表达检测

hPDLSCs细胞接种到分化培养基培养至21 d,参照试剂说明提取RNA并逆转录为cDNA。使用SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>定量PCR酶混合物试剂盒和ABI7300 Real-time RT-PCR仪器进行Real-time RT-PCR。所用引物如表1所示,GAPDH作为内参,通过2<sup>- $\Delta$ CT</sup>方法计算各指标的相对量。

#### 1.2.7 成骨相关功能蛋白的表达检测

hPDLSCs细胞接种到分化培养基培养至21 d,参照试剂说明提取蛋白。以 $\beta$ -actin为内参,Western blot检测Col-I、RUNX2和OCN的表达水平。

## 1.3 统计学方法

实验结果采用SPSS13.0统计软件进行数据处理,实验结果采用两独立样本t检验比较组间差别, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

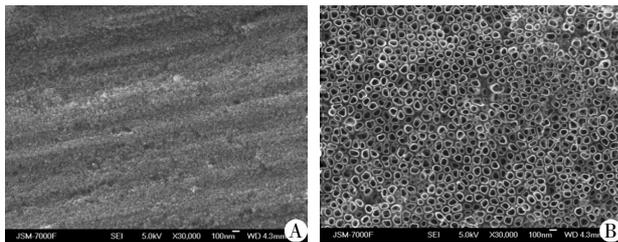
Table 1 Primers used for RT-PCR

基因名称	寡核苷酸序列
Collagen type I	Forward 5'-GACCTCCTCGGAAGACACTC-3' Reverse 5'-TGAAGGGCTTCTTCTGTG-3'
RUNX-2	Forward 5'-TCTTAGAACAATTCTGCCCTTT-3' Reverse 5'-TGCCTTGGTCTTGAAATCACA-3'
Osteocalcin	Forward 5'-AGCAAAGGTGCAGCCTTTGT-3' Reverse 5'-GCGCCTGGGTCTCTTCACT-3'
GAPDH	Forward 5'-GAAGGTGAAGCTCGGAGTC-3' Reverse 5'-GAGATGGTGATGGGATTTC-3'

## 2 结果

### 2.1 TiO<sub>2</sub> 纳米管表面形貌

通过阳极氧化,在实验组纯钛表面制备了 TiO<sub>2</sub> 纳米管阵(图 1B)。扫描电镜图表明实验组的钛材表面所形成的纳米管直径约 100 nm,且多孔有序。对照组(图 1A)的钛表面较光滑,可见机械抛光产生的抛光痕迹。



A: 对照组; B: 实验组。

图 1 试件表面形貌扫描电镜图(× 30 000)

Figure 1 SEM images of surface morphology(× 30 000)

### 2.2 hPDLSCs 细胞增殖

如 MTT 检测所示,在细胞接种于材料 1 d 后,对照组 OD 值略高于实验组,但两者之间并无统计学差异( $P > 0.05$ ),表明两组之间细胞增殖没有差别;4 d 和 7 d 时对照组的吸光度值高于实验组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2)。说明相对于光滑钛表面,TiO<sub>2</sub> 纳米管表面上 hPDLSCs 增殖较慢。

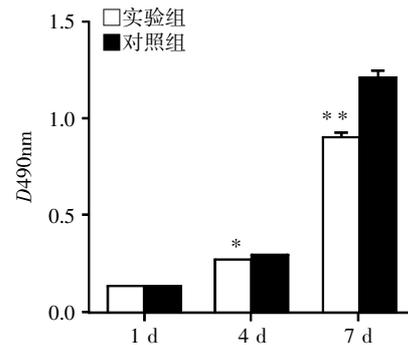
### 2.3 hPDLSCs 细胞 ALP 活性

hPDLSCs 和钛片复合培养 4 d 时,实验组和对照组的细胞 ALP 活性不具有统计学差异( $P > 0.05$ )。继续培养至 7、14 和 21 d,细胞的 ALP 活性值不断增长,实验组 hPDLSCs 的 ALP 活性明显高于对照组表面,组间具有统计学差异( $P < 0.05$ ,图 3)。

### 2.4 hPDLSCs 细胞成骨相关基因及蛋白的表达

hPDLSCs 细胞接种培养后 21 d,试件表面 hPDLSC 的成骨相关基因及蛋白表达水平如图 4 所示。结果表明阳极氧化 TiO<sub>2</sub> 纳米管促进了 hPDLSCs

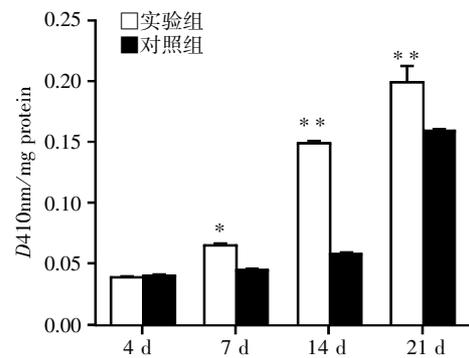
成骨相关基因及蛋白的表达。在图 4A 中 Real-time RT-PCR 检测结果显示,Runx-2、OCN 基因的表达水平实验组明显高于对照组( $P < 0.01$ ),而 Col- I 的基因表达不具有明显差异( $P > 0.05$ ),在图 4B 中 Western blot 检测了 Col-I、Runx-2 和 OCN 的蛋白表达水平,也进一步验证了图 4A 的结果。



与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图 2 hPDLSCs 在钛片表面培养 1、4、7 d 的增殖情况

Figure 2 Proliferation of hPDLSCs co-cultured with samples for 1,4 and 7 d



与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图 3 hPDLSCs 在钛片表面培养 4、7、14、21 d 时 ALP 的活性

Figure 3 ALP activity of hPDLSCs co-cultured with samples for 4,7,14 and 21 d

## 3 讨论

牙周组织不仅是牙齿的一个重要的支撑组织,也有利于平衡和修复周围组织。hPDLSCs 是从牙周组织中分离出来的间充质干细胞,具有多向分化潜能。以往研究显示,hPDLSCs 可以分化为成牙骨质细胞、成骨细胞,进而修复牙周骨缺损,促进组织再生<sup>[3,6]</sup>。拔牙后牙槽窝表面剩余的牙周膜内存在大量 hPDLSCs,且其在拔牙窝的愈合过程中具备较高增殖能力和较强的成骨矿化潜能<sup>[7]</sup>。由此认为,其可以作为种子细胞在即刻种植或早期种植的植体骨结

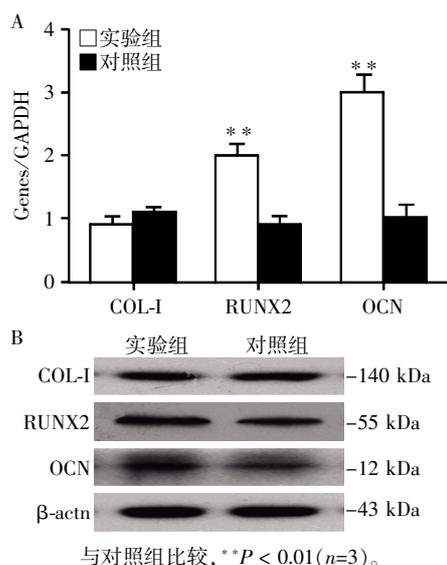


图 4 hPDLSCs 与钛片复合培养 21 d 后的 Col-I、Runx-2、OCN 的基因及蛋白表达水平 (A)Real-time RT-PCR 结果(B)Western blot 结果

Figure 4 Gene/protein expressions of collagen type I, OCN, and Runx-2 of hPDLSCs on the samples at 21 d after culture

合形成过程中发挥重要作用。近年来, 阳极氧化 TiO<sub>2</sub> 纳米管一直是钛及钛合金表面改性的研究重点。已有研究表明 TiO<sub>2</sub> 纳米管阵列, 可促进成骨细胞黏附、增殖和分化。并且对骨髓间充质干细胞(BMSCs)的骨向分化也有促进作用<sup>[8-9]</sup>。但 TiO<sub>2</sub> 纳米管表面处理对 hPDLSCs 的增殖和分化研究较少, 两者之间的相互关系尚不明确。

本实验通过阳极氧化得到 TiO<sub>2</sub> 纳米管阵列, 进一步进行了热处理以增加 TiO<sub>2</sub> 纳米管与钛基体的结合强度。600℃ 以下的热处理可以只改变 TiO<sub>2</sub> 纳米管的晶型, 而不影响其形貌<sup>[10]</sup>。SEM 扫描检测发现, 实验组处理后的表面是多孔和有序的, 所形成的 TiO<sub>2</sub> 纳米管直径约 100 nm, 符合 TiO<sub>2</sub> 纳米管的反应原理, 并且 450℃ 的加热并没有影响表面的形貌。

生物材料表面的细胞增殖受到材料的各种性能的影响, 最近的研究表明, “黏着斑 (focal adhesion)” 是细胞黏附在生物材料表面并进一步增殖的重要影响因素。它主要通过整合素 (integrins) 发挥作用。整合素可以介导细胞间的相互作用和行为, 如黏附、增殖、迁移、分化和基因表达等<sup>[11]</sup>。细胞接种到材料表面后, 细胞开始黏附, 引发整合素的富集, 激活细胞内信号进入细胞核, 进而传递信号到细胞骨架。而纳米结构的直径及纳米结构间的间距是影响、调节整合素富集和黏着斑形成的决定性因素<sup>[12]</sup>。本实

验中 MTT 结果所示, 在第 4 天和第 7 天时, 实验组 hPDLSCs 细胞增殖活性低于对照组, 存在统计学差异。这说明 100 nm 的直径可能大于整合集群和黏着斑形成所需的距离。在细胞增殖的初始阶段 (2~7 d), TiO<sub>2</sub> 纳米管表面 hPDLSCs 的增殖活性要低于光滑钛表面。Vetrone 等<sup>[13]</sup> 的研究也取得了类似的结果, NIH3T3 成纤维细胞在粗糙的纳米结构的钛表面增殖活性较光滑钛表面低。王明等<sup>[14]</sup> 的研究显示大鼠骨髓间充质干细胞在 100 nm TiO<sub>2</sub> 纳米管表面的粘附增殖与光滑钛表面并没有统计学差异。

ALP 是参与骨形成、代谢和再生过程中的重要矿物酶。ALP 活性被认为是细胞骨向分化的早期标志。一般认为, 金属材料表面的粗糙度将影响细胞增殖和分化, 增加表面粗糙度会降低细胞增殖率, 但增加 ALP 活性。另一种可能的解释是: 相比光滑钛表面, TiO<sub>2</sub> 纳米管的表面 (尤其是当退火后形成结晶相), 可以提高羟基磷灰石 (HA) 的沉积。而种植体表面 HA 的沉积可影响细胞的生长<sup>[15]</sup>。此外, 蛋白质的吸附也受到材料粗糙度的影响, 而蛋白质的吸附将进一步促进细胞的分化<sup>[16]</sup>。本实验结果也表明, 在第 7、14 和 21 天, 实验组 hPDLSCs 的 ALP 活性增加, 明显高于对照组。表明钛材表面 TiO<sub>2</sub> 纳米管改性可以促进 hPDLSCs 的成骨分化。

Col-I、Runx-2 和 OCN 等成骨相关因子与骨发生、骨生长及骨重建等过程密切相关。其中, COL-I 和 Runx-2 在细胞成骨分化早期阶段表达, OCN 在成骨分化的相对成熟阶段表达。本实验表明, TiO<sub>2</sub> 纳米管改性可以上调 hPDLSCs 的成骨相关基因及蛋白的表达水平。阳极氧化处理后钛表面呈现出一种多孔的纳米级粗糙表面, 较高的表面粗糙度不仅提高了基质沉积和蛋白质吸附, 还提高了 hPDLSCs 骨向分化过程中重要酶 ALP 的活性, 进而影响了 hPDLSCs 成骨相关蛋白的表达水平。Kubo 等<sup>[17]</sup> 研究证明钛材料表面微纳米形貌, 粗糙度增加, 可以促进成骨细胞 OCN 基因表达水平提高。Hakki 等<sup>[18]</sup> 发现, 钛表面粗糙度与 PDLSCs 的形态变化和骨钙素的高表达呈正相关。

形成良好的种植体骨结合, 不仅成骨细胞是其关键, 与成骨相关的其他细胞也至关重要。本实验中钛材表面的 TiO<sub>2</sub> 纳米管可以显著上调 hPDLSCs 的成骨分化水平和成骨相关功能蛋白的表达。这对口腔种植早期骨结合的形成、即刻种植、早期种植以及种植体周围炎的治疗和组织修复都有着积极的意义。目前, 只研究了钛材 TiO<sub>2</sub> 纳米管直径 (100 nm) 对

hPDLSCs 增殖和骨向分化的影响。在今后的研究中,不同直径的纳米管对 hPDLSCs 成骨和成牙周膜的影响,以及 TiO<sub>2</sub> 纳米管改性所导致的 hPDLSCs 细胞内信号传导通路的改变也是值得进一步研究的问题。

纯钛片表面经阳极氧化处理后形成多孔有序的 TiO<sub>2</sub> 纳米管形貌,早期有减弱 hPDLSCs 增殖活性的倾向,但能够上调 hPDLSCs 的 ALP 活性和成骨相关功能基因及蛋白的表达,表明其具有促进骨向分化的作用。

#### [参考文献]

- [1] Pegueroles M, Aguirre A, Engel E, et al. Effect of blasting treatment and Fn coating on MG63 adhesion and differentiation on titanium; a gene expression study using real-time RT-PCR. [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(3): 617-627
- [2] Kralchevska R, Milanova M, Hristov D, et al. Synthesis, characterization and photocatalytic activity of neodymium, nitrogen and neodymium-nitrogen doped TiO<sub>2</sub> [J]. *Materials Research Bulletin*, 2012, 47(9): 2165-2177
- [3] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-155
- [4] Hidefumi Maeda, Atsushi Tomokiyo, Shinsuke Fujii, et al. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(4): 33
- [5] In SH, Yoon SH, Joo-Hee L, et al. Periodontal ligament stem cells for periodontal regeneration [J]. *Current Oral Health Reports*, 2015, 2(4): 236-244
- [6] 蒋琳, 周鹏飞, 王佳, 等. BMPs-ERK5 信号通路调控人牙周膜干细胞成骨分化的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(7): 718-725
- [7] 王蕾. 牙槽窝来源牙周膜干细胞生物学特性及牙周再生中应用的研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2010
- [8] Sugita Y, Ishizaki K, Iwasa F, et al. Effects of pico-to-nanometer-thin TiO<sub>2</sub> coating on the biological properties of microroughened titanium [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(33): 8374-8384
- [9] Mas-Moruno C, Garrido B, Rodriguez D, et al. Biofunctionalization strategies on tantalum-based materials for osseointegrative applications [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(2): 109
- [10] Zhao JL, Wang XH, Chen RZ, et al. Fabrication of titanium oxide nanotube arrays by anodic oxidation [J]. *Solid State Communications*, 2005, 134(10): 705-710
- [11] Giancotti FG. Nanotechnology in the regulation of stem cell behavior [J]. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2013, 14(5): 1197-1203
- [12] Sjoström T, Dalby MJ, Hart A, et al. Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells [J]. *Acta Biomater*, 2011, 5(5): 1433-1441
- [13] Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, et al. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate [J]. *Nano Lett*, 2009, 9(2): 659-665
- [14] 王明, 杨生, 邓峰, 等. 不同管径钛纳米管对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(12): 1273-1278
- [15] Pittrof A, Bauer S, Schmuiki P, et al. Micropatterned TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces for site-selective nucleation of hydroxyapatite from simulated body fluid [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(1): 424-431
- [16] Her-Hsiung H, Chia-Ping W, Ying-Sui S, et al. Surface nanoporosity of  $\beta$ -type Ti-25Nb-25Zr alloy for the enhancement of protein adsorption and cell response [J]. *Surface and Coatings Technology*, 2014, 259: 206-212
- [17] Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F, et al. Cellular behavior on TiO<sub>2</sub> nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model [J]. *Biomaterials*, 2010, 30(29): 5319-5329
- [18] Hakki SS, Korkusuz P, Purali N, et al. Periodontal ligament cell behavior on different titanium surfaces [J]. *Acta Odontol Scand*, 2013, 71(3-4): 906-916

[收稿日期] 2016-06-27