科学通报 2008 年 第 53 卷 第 1 期: 83 ~ 88
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

钛合金表面纳米结构对成骨细胞黏附的促进作用

嵇伟平[①], 韩培[①], 赵常利[②], 蒋垚[①], 张小农[②*]

① 上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233;
② 上海交通大学材料科学与工程学院, 上海 200240
* 联系人, E-mail: xnzhang@sjtu.edu.cn

2007-09-23 收稿, 2007-11-22 接受
上海市纳米专项基金资助项目(批准号: 0452nm061)

摘要 采用塑性变形和化学处理方法在 Ti6Al4V 合金上制得一种新型多孔纳米晶体的表面结构特征, 通过体外实验研究了成骨细胞在纳米Ti6Al4V合金表面的黏附情况. 将原代培养的大鼠成骨细胞与纳米表面、光滑表面钛合金共培养, 分别通过荧光显微镜、扫描电子显微镜及 RT-PCR 分析等, 观察成骨细胞在不同材料表面的黏附生长情况. 结果表明: 与普通钛合金相比, 纳米表面钛合金早期就能使成骨细胞伪足伸展良好, 促进成骨紧密贴壁和早期融合; 与细胞黏附相关的 Integrin β1 的表达也高于普通钛合金, 这为将纳米技术应用到人工关节等植入器械领域提供了新的方向.

关键词
钛合金
纳米结构
成骨细胞
黏附

随着人工关节置换术的普及, 植入假体的失败越来越受到重视, 原因包括: 磨屑、应力遮挡和骨关节界面结合不佳等多种因素[1,2]. 不仅骨组织本身是纳米结构(无机矿物质颗粒<100 nm), 而且骨组织细胞外基质蛋白也同样达到纳米尺寸. 因此, 研究新一代纳米结构植入材料, 增强成骨细胞与纳米材料相互作用, 可有效防止假体松动, 促进人工假体的长期稳定. 目前关于纳米陶瓷[3~5],1)、纳米纤维[6,7]、纳米聚合物[8,9]和纳米复合物[10]等的生物学效应已有研究, Webster等人[11~14]发现与普通陶瓷相比, 纳米陶瓷不仅能增加成骨细胞的黏附, 还能降低成纤维细胞和上皮细胞的黏附, 有效防止纤维-骨性结合的发生. Elias等人[15]发现成骨细胞在纳米碳纤维上其功能明显增强, 他们认为纳米碳纤维能增加材料表面与周围组织的结合能力, 促进骨整合. McManus等人[16]通过实验制备了纳米级的陶瓷/聚合物复合材料, 并能获得与骨组织相类似的化学结构和生物力学的特征. 由于目前应用的植入假体多为钛合金等金属材料, 本文探索研究钛合金的表面纳米结构对成骨细胞的黏附等生物学效应的影响, 以期促进骨-植入物界面的骨整合, 对防止假体松动有重要意义.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料制备. 纳米表面钛材料制备时首先基于严重塑性变形(SPD)原理将钛合金表面进行纳米化处理, 在真空环境下以一种高能量的金属球轰击钛合金板表面, 经 1 h 的多次反复轰击可以将钛合金表面的微米晶转变为纳米晶, 如文献[17,18]等报道, 并且呈现出从表面到内层的晶体尺寸逐渐增大的梯度分布特征. 其次, 将样品放入一酸性溶液中经 30 min 的电化学腐蚀抛光, 得到表面孔洞结构, 并经其后的超声清洗后使用. 由于纳米表面钛合金的化学活性大大增加, 化学处理时材料表面发生不均匀的腐蚀溶解, 导致原本光滑的表面变成了一种类似多孔结构的粗糙表面, 其组成的晶粒则为纳米量级. 植入材料表面的多孔化、粗糙化处理可以有效提高细胞的长入和假体与组织的结合效果, 这在临床中已广泛使用, 因此, 我们制备的多孔纳米表面钛合金材料具有良好的医学适用性.

(ⅱ) 成骨细胞原代培养. 本研究的生物学实验中, 我们将新生乳鼠头盖骨中的成骨细胞分别种植

1) Sato M, Aslani A, Sambito M A, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite/titania coatings on titanium improves osteoblast adhesion. J Biomed Mater Res A, 2007

于纳米钛合金表面和普通钛合金表面，考察这两种具有不同表面结构的钛合金对成骨细胞的黏附能力影响. 取新生 SD 大鼠颅盖骨组织，用 II 型胶原酶(美国 Sigma)分离成骨细胞. 分离之后，加入含有 15%胎牛血清(美国 Gibico)的 MEM 培养基(美国 Gibico)，放入 5% CO_2 培养箱中，在 37℃条件下培养. 通过测定碱性磷酸酶活性以及矿化结节鉴定成骨细胞. 每 2~3 d 更换培养液，取传至 2~4 代的成骨细胞作为实验细胞.

(iii) 成骨细胞吖啶橙染色及扫描电子显微镜观察. 于 12 孔板中将成骨细胞($1\times10^4/cm^2$)接种于纳米组、光滑组和对照组(培养板)材料表面，放入 5% CO_2 培养箱中，在 37℃条件下进行复合培养. 共培养 2, 6 和 24 h 之后，分别取出 3 组材料，先用 PBS 漂洗去除材料表面未黏附细胞，放入 95%乙醇中固定 10 min，干燥后加入足量的 0.01%吖啶橙(中国华美)磷酸缓冲染液，染色 5 min，在荧光显微镜(日本 Nikon)下进行观察拍照，随机拍摄 5 个视野，用 Image-Pro Plus5.02 (IPP)软件对成骨细胞计数；同时，另取出两组钛合金材料，经 PBS 漂洗后，用 2.5%戊二醛 4℃固定，乙醇梯度脱水，醋酸正戊酯临界点干燥喷金，在 JSM-6460 扫描电子显微镜下观察成骨细胞形态.

(iv) 基因表达. 目前认为，成骨细胞中细胞外基质的结合位点大部分位于Integrin β1 亚基上，因此，integrin β1 亚基在成骨细胞对生物材料的黏附中发挥着主要作用[19]. 本实验中，我们采用RT-PCR技术对成骨细胞Integrin β1 mRNA的转录进行了分析，以期了解纳米表面改变细胞黏附的作用机制. 实验于 12 孔板中将成骨细胞($10\times10^4/cm^2$)接种于光滑组、纳米组和对照组(培养板)材料表面，放入 5%CO_2 培养箱中，在 37℃条件下进行复合培养. 共培养 2 h后，分别取出 3 组材料，先用PBS漂洗去除材料表面未黏附细胞，提取成骨细胞总RNA，反转录成cDNA后进行PCR扩增, PCR产物加样于 2%琼脂糖凝胶、电泳，并在紫外灯下观察，做凝胶分析系统拍照(以β-Actin作内参，对样品中目标基因进行半定量分析). 扩增Integrin β1 mRNA的引物为

(+) 5′-AGGATTACTTCAGACTTCCGCATTG 和 (-) 5′-GAAGGATAATCATAGTAATGGCTCA.

β-Actin 的引物为

(+) 5′-TGTGATGGTGGGTATGGGTCAGAAG 和 (-) 5′-TCACGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAG.

2 结果

2.1 材料表面特征

本实验材料为 Ti6Al4V 合金，采用 2 mm 的板材，经过以上两步法处理得到了表面多孔纳米结构. 分别用 JSM-6460 扫描电子显微镜观察钛合金原始光滑表面和纳米表面，发现普通光滑钛合金表面只有少量划痕等加工特征，如图 1(a)所示；而纳米钛合金表面则已形成了多孔结构，在微米级的大孔内还有纳米级的小孔，通过我们处理的材料表面可形成 15~20 μm 左右的大孔，如图 1(b)显示. 同时，在纳米材料表面的大孔中能够形成 1 μm 左右的小孔，如图 2(a)显示. 从图 2(b)可见材料表面约为 10~20 nm 的晶体颗粒.

2.2 成骨细胞吖啶橙染色及黏附计数

黏附能力测试结果显示(图 3(a))，共培养 2 h 后，纳米组表面黏附的成骨细胞多于光滑组(统计学意义 $P<0.01$)，但与对照组无显著性差异. 共培养 6 和 24 h 后，纳米组表面黏附的成骨细胞的数量高于光滑组和对照组($P<0.01$). 图 3(b)和(c)是共培养 2 h 后，成骨细胞吖啶橙荧光显色的照片，显示纳米表面上成骨细胞数量显著多于普通表面.

2.3 成骨细胞扫描电子显微镜观察

实验采用扫描电子显微镜观察了不同时间点成骨细胞在两组材料表面的黏附形态. 共培养 2 h 后，光滑组表面细胞大多呈球形，少有细胞伸展开来(图 4(a)). 而纳米组表面成骨细胞已有较多突起，伪足伸展良好，细胞大多伸展开来，并紧密贴壁(图 4(b)). 共培养 6 h后，光滑组表面细胞开始变得扁平，逐渐伸展开来，细胞边缘比较光滑，突起较少，隆起的细胞核呈圆形，细胞之间相对独立，缺乏联系(图 4(c)). 纳米组表面细胞开始融合，并呈现出大片“多叶卷曲”的汇合形状(图 4(d)). 共培养 24 h 后，光滑组表面细胞较之 6 h时更加扁平，呈梭形状，突起变多，细胞之间开始汇合. 纳米组表面细胞不仅贴壁、伸展良好，而且细胞增殖旺盛，呈复层生长.

2.4 基因表达

实验结果表明，纳米组表面黏附的成骨细胞中 Integrin β1 mRNA 的转录量升高(图 5)，提示我们制备的纳米组钛合金表面的纳米结构对成骨细胞整合

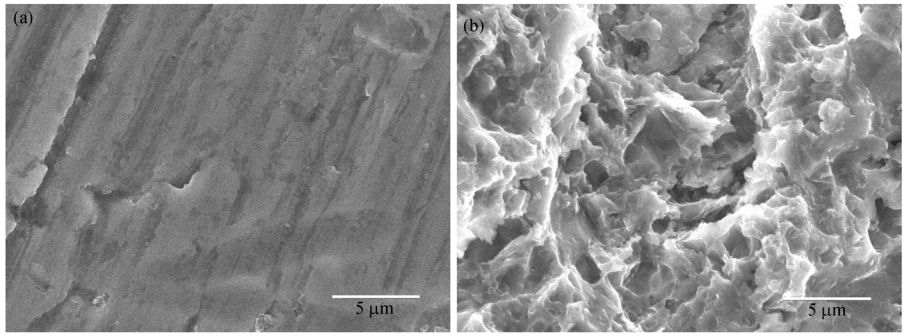

图 1　钛合金原始光滑表面(a)与纳米表面(b)的结构

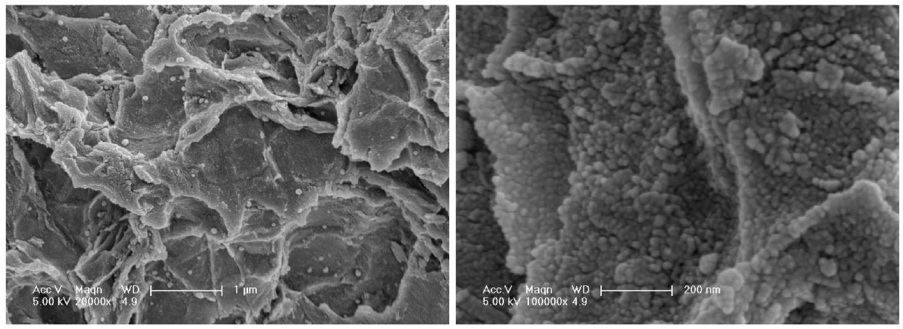

图 2　高分辨扫描电子显微镜观察下钛合金纳米表面的结构

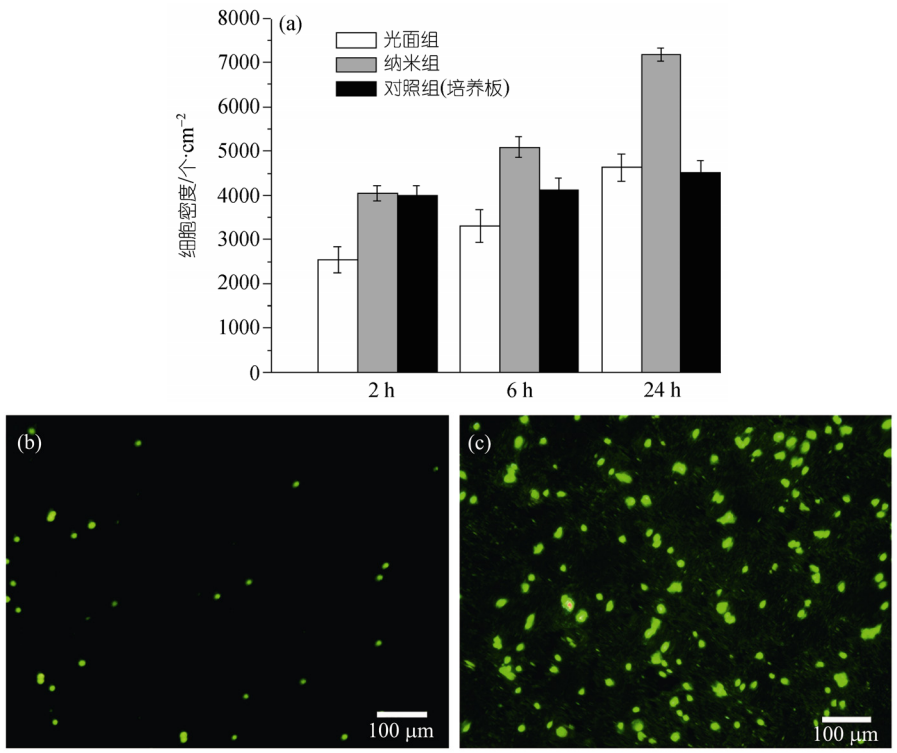

图 3　不同钛合金表面对成骨细胞黏附的影响

(a)培养 2, 6, 24 h 后，成骨细胞分别在光滑与纳米钛合金表面细胞黏附密度有统计学差异，标准差由 3 次实验得到, $P < 0.01$; (b)和(c)培养 2 h 后光滑钛合金和纳米钛合金表面成骨细胞吖啶橙荧光显色

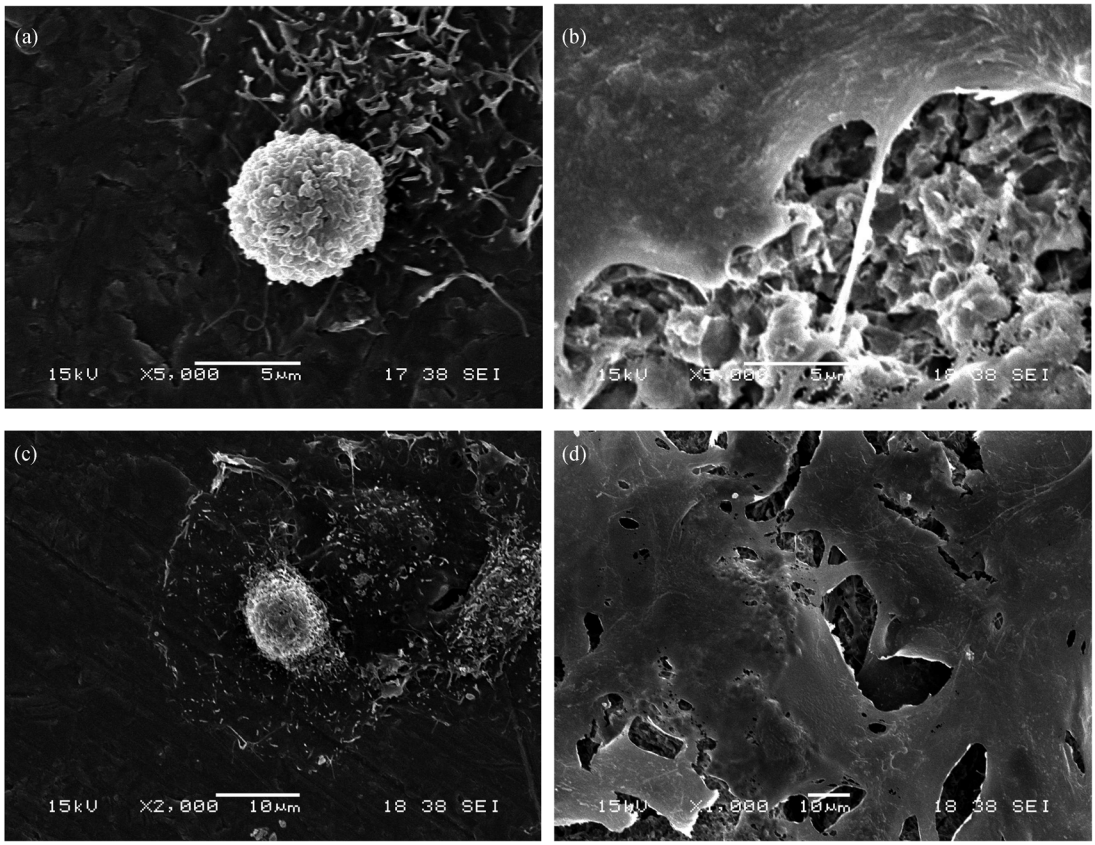

图 4 不同钛合金表面的成骨细胞的 SEM 细胞形态比较

(a) 培养 2 h 后光滑钛合金表面细胞呈球形, 细胞伪足未伸展开来; (b) 培养 2 h 后纳米钛合金表面成骨细胞突起较多, 伪足伸展良好, 细胞已伸展; (c) 培养 6 h 后光滑钛合金表面成骨细胞扁平, 细胞边缘较光滑, 隆起的细胞核呈圆形, 细胞之间缺乏联系; (d) 培养 6 h 后纳米钛合金表面成骨细胞开始融合, 并呈现出大片“多叶卷曲”的汇合形状

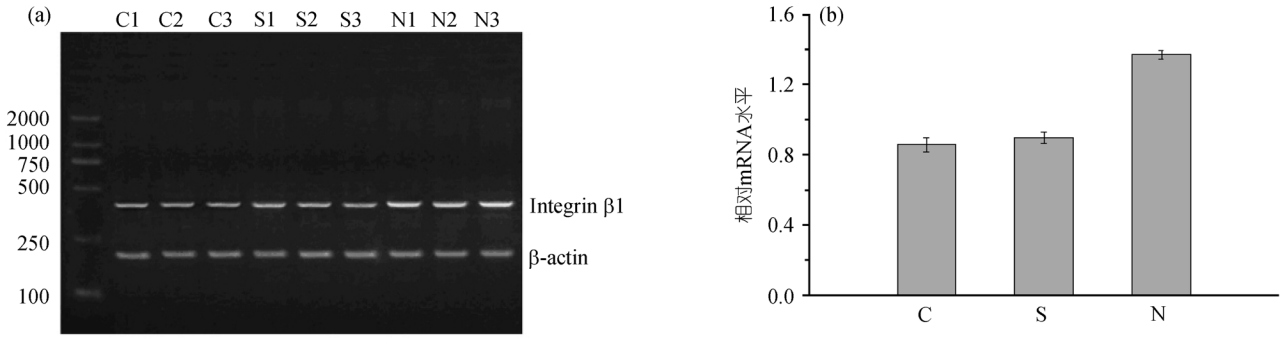

图 5 不同钛合金表面的成骨细胞 Integrin β1mRNA 的表达

(a) 成骨细胞在对照组(C1-3)、光滑组(S1-3)和纳米组(N1-3)培养 2 h 后 Integrin β1mRNA 的表达; (b) 成骨细胞分别在光滑(S)与纳米(N)钛合金表面 Integrin β1 mRNA 的表达(β-Actin 作内参)有统计学差异, $P < 0.01$, 标准差由 3 次实验得到

素介导的早期黏附信号转导通路产生了影响；同时 Integrin β1 作为成骨细胞黏附相关的基因，其相对较高的表达与纳米钛合金表面能够诱导大量成骨细胞黏附的结果也是一致的.

3 讨论

细胞黏附是成骨细胞和植入材料接触的第一步，它将直接影响成骨细胞在假体表面的增殖、分化和钙化以及随后的人工假体与周围骨组织之间的骨整合. 本文的体外实验证明纳米表面钛合金对成骨细胞的黏附能力强于普通钛合金，纳米表面早期就能观察到成骨细胞伪足伸展良好，紧密贴壁，较早出现融合，并能上调与成骨细胞黏附相关的 Integrin β1 mRNA 的表达，这表明钛合金表面的纳米结构对成骨细胞整合素介导的早期黏附信号转导通路产生了影响，为成骨细胞进一步增殖、分化提供了有利条件.

本研究制备的多孔纳米表面钛合金，不仅比普通光滑表面的粗糙程度大大增加，提供了更多的面积，更易吸附包括纤维连接蛋白、玻璃体结合蛋白在内的细胞外基质蛋白(它们都含有 RGD 序列)；而且，纳米表面的电化学性质发生了变化[20]，使得含有RGD序列的细胞外基质蛋白可暴露更多的结合位点与整合素结合，从而增强成骨细胞与植入材料的黏附[21]. 另外，纳米材料相对普通材料表面具有更多的晶界，合金的晶界具有更活泼的表面性质，可以影响初期蛋白质的相互作用，介导随后的细胞黏附[22]. 最近文献[23]报道了通过HPT原理制备的纳米纯钛表面的亲水性比原始钛表面显著提高，而亲水性的提高能够促进介导材料与成骨细胞的早期黏附的一些大分子的吸附，这有助于改善成骨细胞的黏附性.

4 结论

(1) 基于 SPD 原理和电化学处理的表面纳米化技术可以在钛合金表面得到一种类似多孔结构的粗糙表面，其组成的晶粒则为纳米量级.

(2) 体外细胞实验表明钛合金的纳米表面结构改变了成骨细胞的基因表达，促进了成骨细胞的黏附功能，使钛合金具有了纳米生物学的优点.

总之，钛合金表面纳米处理技术如果能应用到人工关节等与骨接触的界面，将可为减少或延缓假体松动的发生提供新的方向.

参考文献

1 Jiranek W A, Whiddon D R, Johnstone W T. Late loosening of press-fit cementless acetabular components. Clin Orthop Relat Res, 2004, 418: 172—178[DOI]

2 Ong A, Wong K L, Lai M, et al. Early failure of precoated femoral components in primary total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Am A, 2002, 84(5): 786—792

3 Popat K C, Leary Swan E E, Mukhatyar V, et al. Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response. Biomaterials, 2005, 26(22): 4516—4522[DOI]

4 Price R L, Gutwein L G, Kaledin L, et al. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. J Biomed Mater Res, 2003, 67: 1284—1293[DOI]

5 Sato M, Sambito M A, Aslani A, et al. Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium. Biomaterials, 2006, 27(11): 2358—2369[DOI]

6 Fujihara K, Kotaki M, Ramakrishna S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. Biomaterials, 2005, 26(19): 4139—4147[DOI]

7 Woo K M, Chen V J, Ma P X. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. J Biomed Mater Res A, 2003, 67(2): 531—537[DOI]

8 Thapa A, Webster T J, Haberstroh K M. Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion. J Biomed Mater Res A, 2003, 67(4): 1374—1383[DOI]

9 Webster T J, Smith T A. Increased osteoblast function on PLGA composites containing nanophase titania. J Biomed Mater Res A, 2005, 74(4): 677—686

10 Kay S, Thapa A. Haberstroh K M, et al. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte

adhesion. Tissue Eng, 2002, 8(5): 753—761[DOI]

11 Webster T J, Siegel R W, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. Biomaterial, 1999, 20: 1221—1227[DOI]

12 Webster T J, Ergun C, Doremus R H, et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. Biomaterials, 2000, 21: 1803—1810[DOI]

13 Webster T J, Ergun C, Doremus R H, et al. Enhanced functions of osteoblast-like cells on nanophase ceramics. Biomaterials, 2001, 22: 1327—1333[DOI]

14 Webster T J, Ergun C, Doremus R H, et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. J Biomed Mater Res, 2000, 51: 475—483[DOI]

15 Elias K L, Price R L, Webster T J. Enhanced funtions of osteoblsts on nanometer diameter carbon fibers. Biomaterials, 2002, 23: 3279—3287[DOI]

16 McManus A J, Doremus R H, Siegel R W, et al. Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites. J Biomed Mater Res A, 2005, 72(1): 98—106[DOI]

17 Lu K, Lu J. Nanostructured surface layer on metallic materials induced by surface mechanical attrition treatment. Mater Sci Eng A, 2004(375-377): 38—45

18 Tong W P, Tao N R, Wang Z B, et al. Nitriding iron at lower temperatures. Science, 2003, 299: 686—688[DOI]

19 Gronthos S, Stewart K, Graves S E. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res, 1997, 12: 1189—1197[DOI]

20 Zhang X N. Biomechanical and biocorrosion properties of nanostructured titanium. Advanced Materials Research, 2007, (29-30): 51—54

21 Balasundaram G, Sato M, Webster T J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. Biomaterials, 2006, 27(14): 2798—2805[DOI]

22 Webster T J, Ejiofor J U. Increased osteoblast on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V and CoCrMo. Biomaterials, 2004, 25: 4731—4739[DOI]

23 Faghihi S, Azari F, Zhilyaev A P, et al. Cellular and molecular interactions between MC3T3-E1 pre-osteoblasts and nanostructured titanium produced by high-pressure torsion. Biomaterials, 2007, 28(27): 3887—3895[DOI]